

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Jana Mikulecká

VÝVOJ ANALYTICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ FOSFORYLOVANÝCH
SLOŽEK BAKTERIÁLNÍCH BUNĚČNÝCH MEMBRÁN

Development of analytical methods for determination of
phosphorylated components of bacterial cell membranes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2013

Poděkování

Touto cestou si dovoluji poděkovat svému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady a připomínky během práce v laboratoři analytické chemie. Mé poděkování dále náleží RNDr. Gabriele Seydlové, Ph.D. za ochotu a čas, který mi věnovala během mé práce na Katedře genetiky a mikrobiologie, a také jí velmi děkuji, že jsem se mohla naučit novým technikám.

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením příslušného vedoucího diplomové práce a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu, které jsem správně a úplně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
podpis

Abstrakt:

Fosfolipidy jsou dominantními komponentami bakteriálních buněčných membrán, v nichž tvoří fosfolipidové dvojvrstvy. Bakterie se liší svým fosfolipidovým složením, což umožňuje stanovení a identifikaci významných skupin mikroorganismů. Lze však sledovat i změnu fosfolipidového zastoupení u bakterií stejného druhu, protože složení je ovlivněno celou řadou environmentálních podmínek. K identifikaci a stanovení bakteriálních fosfolipidů se běžně využívá tenkovrstvá chromatografie zejména pro svou minimální instrumentaci. Nevýhodou této metody je časová náročnost a požadavky na pečlivost a zručnost pracovníka.

Rostoucí zájmem o fosfolipidové dvojvrstvy napomáhá k podrobnějšímu prozkoumání složení mastných kyselin, neboť detailnější analýzy umožňují zjistit o mikroorganismech ještě více. Pro tyto účely se zdá být tou nejlepší volbou plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií. Metoda slouží jak k identifikaci, tak k určení celkového zastoupení mastných kyselin v molekule fosfolipidu. Dále je využívána k určení polohy a počtu izomerií dvojných vazeb a funkčních skupin na uhlovodíkovém řetězci.

Zatímco pro identifikaci a stanovení nepolárních částí fosfolipidů již existuje vhodná a osvědčená analytická metoda, doposud nebyla vyvinuta žádná analytická metoda zabývající se studiem polárních částí fosfolipidů, tedy fosforylovaných sloučenin. Přitom by i tato rozmanitá skupina látek přispěla k podrobnějšímu zkoumání fosfolipidových dvojvrstev.

Cílem této diplomové práce je vývoj a optimalizace rychlé, citlivé a robustní instrumentální analytické metody pro identifikaci a kvantifikaci standardů fosfolipidů (fosfatidylethanolaminu, fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolu, kardiolipinu) a standardů fosforylovaných sloučenin (fosfoethanolaminu, fosfoserinu, fosfoglycerolu) z cytoplazmatické membrány bakterie *Bacillus subtilis*. Byly připraveny tyto reálné vzorky fosfolipidů izolované z této bakterie: fosfatidylglycerol, kardiolipin fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin a kyselina fosfatidová. S ohledem na iontovou povahu studovaných látek a komplikovanou matici byly vybrány analytické metody nukleární magnetická rezonance, kapalinová chromatografie a kapilární zónová elektroforéza.

Bylo zjištěno, že nejméně vhodnou metodou je nukleární magnetická rezonance. Velké množství vzorku, které se obtížně izoluje z lipidových extraktů bakteriální membrány, nezbytné pro naměření spektra, a pomalá analýza spekter, která může trvat několik hodin, jsou hlavní nevýhody této metody. Dále byla pozornost věnována stanovení fosfolipidů a fosforylovaných sloučenin metodou kapalinové chromatografie. Bylo zjištěno, že UV/VIS detekce není dostatečně selektivní a citlivá. Poslední část diplomové práce se zabývá kapilární elektroforézou ve vodném a nevodném prostředí, kterou se podařilo fosfolipidy separovat. Stanovení fosforylovaných sloučenin bylo možné pouze za použití bezkontaktního vodivostního detektoru.

Klíčová slova:

Bakteriální cytoplazmatická membrána, *Bacillus subtilis*, fosfolipidy, fosforylované látky, plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, nukleární magnetická rezonance, kapilární zónová elektroforéza, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem.

Abstract:

Phospholipids are dominant components of bacterial cell membranes, where they create double layers. Bacteria differ in their phospholipid composition determination of which can help in identification of important groups of microorganisms. Phospholipid composition of bacteria is influenced by many environmental factors, therefore its variation can be observed within one bacterial stem also. Because of its simplicity, thin layer chromatography is usually applied to identification and determination of bacterial phospholipids. Disadvantage of this method are the high demands of time, carefulness and skills of the analytical personnel.

The increasing interest in the phospholipid double-layer promotes the detailed investigation of their fatty acid composition because the more detailed analyses allows for more information yield about bacteria. Gas chromatography hyphenated with mass spectrometry seems to be the best choice for these purposes. Fatty acid identity and total fatty acid content in phospholipid molecules could be determined by this method. Additionally, number, position and isomerism of double bonds and presence of other functional groups on hydrocarbon chain could be determined.

Whereas a suitable and approved analytical method exists for identification and determination of nonpolar phospholipid branches no analytical method has been developed to study the polar parts of phospholipids, i.e. phosphorylated compounds. Nevertheless, this miscellaneous group of compounds has contributed to the deeper understanding of phospholipid double-layers.

The goals of this diploma thesis are the development and optimization of fast, sensitive and robust instrumental analytical method for identification and quantitation of phospholipids (phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylglycerol, cardiolipin) and phosphorylated compounds (phosphoethanolamine, phosphoserine, phosphoglycerol) from cytoplasmic membrane of bacterium *Bacillus subtilis*. Real samples of phospholipids isolated from this bacterium were prepared, namely phosphatidylglycerol, cardiolipin, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and phosphatidic acid. With respect to the ionic state of compounds of interest and to the complex matrix nuclear magnetic resonance, liquid chromatography and capillary zone electrophoresis were chosen as analytical methods.

Nuclear magnetic resonance has been found to be the less suitable method. Large sample amount, which is difficult to isolate from lipid extracts of bacterial membrane, necessary for spectra collection and slow analysis, which can take several hours, are the main disadvantages of the method. High performance liquid chromatography was the next selected method for determination of phospholipids and phosphorylated compounds. The UV/Vis detection applied in this method was found to be insufficiently selective and sensitive. The last part of the thesis is focused on the application of capillary zone electrophoresis in aqueous and non-aqueous media, which allowed the separation of phospholipids. Only under application of contactless conductivity detector the detection and determination of phosphorylated compounds was possible.

Keywords:

Bacterial cytoplasmic membrane, *Bacillus subtilis*, phospholipids, phosphorylated compounds, gas chromatography, thin layer chromatography, high-performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance, capillary zone electrophoresis, matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	12
2.2 Cytoplazmatická membrána bakterií	13
2.2.1 Chemické složení bakteriální cytoplazmatické membrány	13
2.2.2 Fosfolipidy bakteriální membrány <i>B. subtilis</i>	14
2.2.3 Struktura fosfolipidů	14
2.2.4 Mastné kyseliny bakteriálních fosfolipidů.....	15
2.2.5 Biosyntéza fosfolipidů	16
2.2.6 Faktory ovlivňující složení cytoplazmatické membrány.....	17
2.3 Metody analýzy mastných kyselin fosfolipidů.....	18
2.3.1 Plynová chromatografie	18
2.4 Metody analýzy fosfolipidů a jejich polárních částí	19
2.4.1 Tenkovrstvá chromatografie	19
2.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	21
2.4.3 Nukleární magnetická rezonance.....	22
2.4.4 Kapilární zónová elektroforéza	23
2.4.5 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem.....	25
2.4.6 Shrnutí významných technik při analýzách fosfolipidů	27
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
3.1 Příprava reálných vzorků fosfolipidů.....	29
3.1.1 Materiál, metody, přístroje	29
3.1.2 Kultivace <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	30
3.2 HPLC.....	31
3.2.1 Materiál, metody, přístroje	31
3.2.2 Vlastní měření	32
3.3 NMR.....	33
3.3.1 Materiál, metody a přístroje	33
3.3.2 Vlastní měření	34
3.4 CZE	34

3.4.1	Materiál, metody a přístroje	34
3.4.2	Vlastní měření	36
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	37
4.1	Příprava reálných vzorků fosfolipidů	37
4.2	HPLC.....	38
4.3	NMR.....	41
4.4	CZE	43
5	ZÁVĚR.....	46
	LITERATURA	48
	PŘÍLOHY	51

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AG3PAT	1-acylglycerol-3-fosfát acyltransferáza
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosintrifosfát
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor (contactless conductivity detector)
CDP-diglycerid	cytidin-5-fosfát-diglycerid
<i>cdsA</i>	CDP-diacylglycerol syntetáza
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
CEC	kapilární elektrochromatografie (Capillary Electrochromatography)
c_g	hmotnostní koncentrace
CHCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
CL	kardiolipin
<i>cls</i>	kardiolipin syntetasa
CTP	cytidintrifosfát
CZE	kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)
CHES	kyselina 2-(cyklohexylamino)ethansulfonová
DAD	diodový detektor (Diode-Array Detektor)
DAG	diacylglycerol
d_i	vnitřní průměr
<i>dgk</i>	diacylglycerol kinasa
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
<i>E. coli</i>	<i>Escherichie coli</i>
EDTA	dihydrát kyseliny ethylendiamintetraoctové
ELSD	evaporativní detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)
EOF	elektroosmotický tok (Electroosmotic Flow)
ESI	Elektrosprejová ionizace (Electrospray ionization)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
G3P	glycerol-3-fosfát
G3PAT	glycerol-3-fosfát acetyltransferasa
G3PD	glycerol-3-fosfát dehydrogenasa
HPLC	vysokoučinná kapilární elektroforéza (High-Performance Capillary Electrophoresis)
L_c	celková délka kapiláry
L_D	efektivní délka kapiláry
Lysyl-PG	lysylfosfatidylglycerol
MALDI-TOF MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization)

MEKC	Time-Of-Flight Mass Spectrometry) micelární elektrokinetická chromatografie (Micellar Electrokinetic Chromatography)
M_r	molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NACE	kapilární elektroforéza v nevodném prostředí (Nonaqueous Capillary Electrophoresis)
OD	optická denzita
OD	vnější průměr
PA	kyselina fosfatidová
PC	papírová chromatografie (Paper Chromatography)
PE	fosfatidylethanolamin
PG	fosfatidylglycerol
PGP	fosfatidylglycerolfosfát
<i>pgp</i>	fosfatidylglycerolfosfát fosfatasa
<i>pgsA</i>	fosfatidylglycerolfosfát syntetasa
PI	fosfatidylinositol
PS	fosfatidylserin
<i>psd</i>	fosfatidylserin dekarboxylasa
PS dekarboxylasa	fosfatidylserin dekarboxylasa
<i>pssA</i>	fosfatidylserin syntetasa
PS syntetasa	fosfatidylserin syntetasa
^{31}P NMR	fosforová nukleární magnetická rezonance (Phosphorus -31 Nuclear Magnetic Resonance)
rpm	počet otáček za minutu (rounds per minute)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast záření
λ	vlnová délka

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Buněčné membrány představují nezbytné komponenty všech buněk. Hrají důležitou roli při ukotvení cytoskeletu, obklopují cytoplazmu a udělují buňce tvar, čímž oddělují intracelulární komponenty od extracelulárního prostředí. Dochází tak k řízenému transportu látek dovnitř a ven z buňky, což zaručuje její správnou funkci a ochranu. Jsou zde zajištěny membránově vázané funkce a děje, které jinde nemohou probíhat. Biomembrány jsou sídlem dýchacích enzymů, enzymů syntézy a hydrolýzy fosfolipidů, systému oxidační fosforylace, na membránách je situován aparát fotosyntézy, ATP-asa atd. Díky navázaným specifickým receptorům dochází ke zpracování informací a mezibuněčné komunikaci.

Strukturním základem buněčné membrány je fosfolipidová dvojvrstva tvořená fosfolipidy, dominantními komponentami, které se jinde prakticky nevyskytují, a proteiny s malým množstvím vázaných sacharidů. Z chemického hlediska jsou fosfolipidy amfipatické molekuly, které v poloze C_3 *sn*-glycerolu obsahují polární fosforylovou hlavičku odvozenou od alkoholu, zatímco poloha C_1 a C_2 *sn*-glycerolu je esterifikována dlouhým řetězcem mastných kyselin.

V poslední době je studiu fosfolipidů přikládán stále větší význam, neboť jak bylo zjištěno, zásahem do fosfolipidové dvojvrstvy dochází k narušení jejího složení a tedy nesprávné funkci. Důsledkem takového zásahu může být např. změna fluidity membrány, způsobená změnou v poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin, která může významně ovlivnit transport látek přes membránu, buněčnou signalizaci atd. Fosfolipidy jsou velmi často studovány u bakterií, které mají velký potenciál adaptace na širokou škálu podmínek prostředí, a z jejichž cytoplazmatické membrány jsou izolovány.

Identifikace a zastoupení fosfolipidů umožňují zjistit o mikroorganismech více. Každý bakteriální druh se liší druhy fosfolipidů ve své buněčné membráně a jejich identifikace a stanovení umožňuje odhadnout zastoupení např. ekologicky významných skupin mikroorganismů ve společenstvu (gram-pozitivní, gram-negativní bakterie atd.). Lze však studovat i změnu fosfolipidového zastoupení u bakterií stejného druhu, protože složení je také ovlivněno celou řadou environmentálních podmínek. Takto lze např. odhadnout fyziologický stav společenstva (stres, nedostatek živin atd.).

K identifikaci a stanovení bakteriálních fosfolipidů se běžně využívá tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC) pro svou minimální instrumentaci a finanční dostupnost. Běžně se používá k separaci několika složek najednou (až deseti) a identifikaci či semikvantitativní vizuální analýze vzorků. Jako mobilní fáze slouží směs rozpouštědel o různé polaritě. Stacionární fázi představuje silikagel rovnoměrně nanesený ve formě suspenze na skleněnou desku. Díky svému kyselému charakteru a volným polárním $-OH$ skupinám jsou přednostně zadržovány zásadité fosfolipidy. Poté následuje detekce separovaných zón vhodným činidlem a identifikace. Při kvantitativní analýze jsou jednotlivé skvrny fosfolipidů vyškrábány z tenké vrstvy silikagelu a zmineralizovány vhodným činidlem, čímž dojde k převedení organického fosfátu na anorganický. Koncentrace fosfátu se následně určí spektrofotometricky.

Je tedy patrné, že jednoduchost, minimální instrumentace, separace až deseti složek najednou a finanční dostupnost patří k pozitivům této metody. Avšak časová náročnost spolu s požadavky na pečlivost a zručnost pracovníka patří k velkým nevýhodám. Další nevýhody spočívají v obtížném určení reprodukovatelných hodnot retardačních faktorů (R_f) a pracném vyškrábání skvrny z vrstvy silikagelu.

S postupem času rostl zájem o podrobnější prozkoumání fosfolipidů, a to na úrovni mastných kyselin, neboť detailnější analýzy umožňují zjistit o mikroorganismech ještě více. Vlastní stanovení je opět čistě chemicko-analytické, zahrnuje sekvenci extrakčních a separačních kroků (TLC) zakončených chromatografickou koncovkou. Osvědčenou chromatografickou koncovkou se stala plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC), která slouží jak k identifikaci, tak k určení celkového zastoupení mastných kyselin v molekule fosfolipidu a mimo jiné umožňuje určit polohu a počet izomerií dvojných vazeb nebo funkčních skupin na uhlovodíkovém řetězci. Samotné analýze však předchází izolace mastné kyseliny z fosfolipidu, tedy oddělení polární části od řetězců mastných kyselin. Dále musí být splněna podmínka těkavosti a dostatečné tepelné stability mastných kyselin. Touto úpravou se rozumí derivatizace (transesterifikace) molekul mastných kyselin na methylestery. Důležitým parametrem je volba stacionární fáze, protože zásadně ovlivňuje retenční pořadí esterů mastných kyselin s různým počtem dvojných vazeb při stejné délce uhlovodíkového řetězce. Aby byla zajištěna vysoká separační schopnost složitějších směsí a citlivost metody, bývá kombinována s hmotnostní spektrometrií (GC-MS).

Zatímco jsou nepolární části fosfolipidů úspěšně metodou GC-MS analyzovány, pro analýzu polární části molekuly vzniklé při derivatizaci mastných kyselin nebyla doposud optimalizována žádná analytická metoda. Přitom i samotné fosforylované sloučeniny tvoří velmi rozmanitou a zajímavou skupinu látek, které by také přispěly k detailnějšímu studiu mikroorganismů z jiného hlediska.

Předkládaná diplomová práce se tedy zabývá studiem fosfolipidů a fosforylovaných sloučenin. Cílem bylo najít a optimalizovat vhodnou analytickou metodu, kterou by bylo možné stanovit oba typy sloučenin. V případě fosfolipidů byla snaha o nalezení takové analytické metody, která by ještě více usnadnila a především urychlila proces stanovení celé molekuly. Kvalitativní i kvantitativní analýza by se tak zkrátila řádově z několika dnů na desítky minut. Na stanovení fosforylovaných sloučenin byly kladeny tyto požadavky: dostatečná rychlost analýzy, dobrá účinnost separace, dobrá citlivost a reprodukovatelnost, malá spotřeba vzorků a činidel, finanční dostupnost. Po prostudování odborné literatury se jako vhodné analytické metody jeví kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapalinová chromatografie (HPLC), hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) a nukleární magnetická rezonance (NMR). Každá z těchto metod má oproti ostatním metodám své výhody a nevýhody, ale všechny jsou vhodné pro analýzu látek iontové povahy v komplikovaných maticích.

V diplomové práci jsem se zabývala fosfolipidovým složením bakterie *Bacillus subtilis* ATCC 21332, neboť tato gram-pozitivní bakterie patří k nepatogenním bakteriím běžně využívaným v laboratořích. S ohledem na kultivační teplotu patří tento druh mezi mezofilní bakterie (teplotní optimum je 30 °C). Díky osekvenovanému genomu patří k nejvíce prostudovaným bakteriálním druhům. Je sporulující tyčinkovitou bakterií běžně se vyskytující v půdě a je také producentem antibiotik polypeptidové povahy. Nejvíce zastoupenými fosfolipidy v cytoplazmatické membráně *B. subtilis* jsou fosfatidylglycerol (PG), fosfatidylethanolamin (PE), difosfatidylglycerol (kariolipin, CL) a fosfatidylserin (PS). V menší míře jsou zastoupeny kyselina fosfatidová (PA) a lysylfosfatidylglycerol (lysylPG). V rámci podrobnějších studií byl dále zjištěn výskyt až 90 % větvených mastných kyselin, z nichž anteiso-C_{15:0}, iso-C_{17:0} a anteiso-C_{17:0} patří k majoritním.

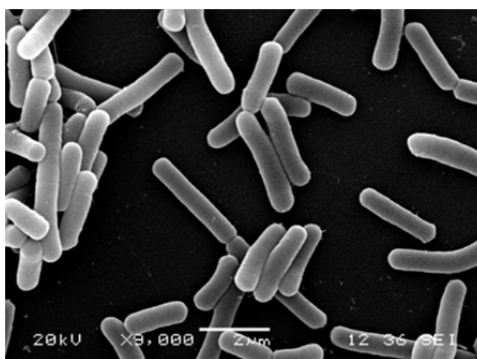
Prvním cílem diplomové práce je tedy produkce dostatečného množství fosfolipidů, izolace lipidových extraktů z bakteriální biomasy *Bacillus subtilis* ATCC 21332 a příprava biologických vzorků pro optimalizovanou analytickou metodu. Druhým cílem diplomové práce je nalézt vhodné experimentální podmínky na vybraných analytických metodách CZE, HPLC a NMR pomocí zvolených standardů fosfolipidů fosfatidylserinu (PS), fosfatidylethanolaminu (PE), fosfatidylglycerolu (PG),

kardiopinu (CL), a standardů fosforylovaných sloučenin fosfoserinu, fosfoglycerolu a fosfoethanolaminu. Metoda, která splnila veškeré požadavky a kterou se úspěšně podařilo analyty analyzovat, by měla do budoucna sloužit jako univerzální metoda pro stanovení jakýchkoliv fosforylovaných látek. Posledním cílem byla analýza reálných vzorků fosfolipidů izolovaných z membrány *B. subtilis* již optimalizovanou metodou.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je tyčinkovitá gram-pozitivní aerobní bakterie (**Obr. 2-1**). Buňky jsou poměrně velké o délce 1,8 – 4,8 μm a šířce 0,9 – 1,1 μm a na jednom pólu mají svazek peritrichálních bičíků, umožňujících buňkám pohyb. *B. subtilis*, jehož genom byl osekvenován v roce 1992 je modelovým organismem pro studium gram-pozitivních bakterií podobně jako je *Escherichia coli* modelovou gram-negativní bakterií. Charakteristickým znakem *B. subtilis* je tvorba klidových nemetabolizujících stádií – rezistentních endospor [1,2,3,4].



Obrázek 2-1 Fotografie *Bacillus subtilis* (kmen 168) pod elektronovým mikroskopem (SEM) [5]

Proces sporulace probíhá jen za přítomnosti kyslíku, neboť při tvorbě obalů endospory získává buňka energii především oxidací zásobních lipidů z cytoplazmy (kyselina poly- β -hydroxymáselná) [1,6]. Aby sporulace proběhla kompletně za vzniku zralé a odolné spory, musí být všechny geny, účastníci se tohoto procesu, nepoškozené. V průběhu buněčného růstu (tj. vegetativní stadium buňky) je projev těchto genů potlačen. V případě poškození či mutace genů dojde buď k zastavení sporulace v různých stádiích, nebo sporulace ani nezačne [7]. Endospory vznikají uvnitř mateřské buňky, kde se formují do elipsoidního tvaru. V jedné mateřské buňce může vzniknout až jedna spora, přičemž původní mateřská buňka po jejím vzniku lyzuje [2]. Vzniklé spory jsou neobyčejně odolné, čímž bakterii zajišťují přežití při nepříznivých vlivech životního prostředí, jako jsou vysoké teploty, ultrafialové a radioaktivní záření, vyschnutí a působení většiny dezinfekčních činidel. Jakmile má buňka vhodné podmínky pro růst, opět se vyklíčí (proces germinace) a diferencuje na vegetativní buňku [1].

Bacillus subtilis patří k velmi rozšířeným druhům, jež se vyskytují ubikvitérně v přírodě, neboť není růstově náročný a také dobře roste v laboratořích na běžných kultivačních médiích. Pokud je v tekuté půdě dostatek potřebných živin, probíhá růst definovaným způsobem. Při růstu na polysacharidových substrátech (potraviný obsahující obiloviny nebo škrob) *B. subtilis* produkuje toxiny, které mohou vyvolat enterotoxikózu. Inkubační doba trvá 1 až 14 hodin a k příznakům patří nevolnost, břišní křeče, průjem a zvracení [1,7]. Protože je jen zřídka zodpovědný za otravu, je považován za nízké patogenní bakterii. Velmi často je však tento druh využíván průmyslově, neboť produkuje antibiotika polypeptidové povahy (např. bacitracin, gramicidin a polymyxin) [4,7].

2.2 Cytoplazmatická membrána bakterií

Cytoplazmatická membrána bakterií je velmi jemná a tenká membránová struktura (asi 8 nm) představující 10 – 20 % suché hmotnosti bakterie [2,7]. U většiny bakterií je jedinou membránovou strukturou obklopující celou cytoplazmu, čímž izoluje vnitřní prostředí buňky od okolního a udává tak buňce tvar. Je vysoce selektivní semipermeabilní osmotickou bariérou, na které dochází díky přítomnosti bílkovinných přenašečů (membránových proteinů) k tvorbě protonového gradientu, syntéze ATP a dochází zde k transportu látek dovnitř a ven z buňky, čímž efektivně reguluje jejich poměr [1,2]. Z cytoplazmatické membrány bakterií vybíhají do cytoplazmy vychlípeniny, jejichž počet a velikost závisí na druhu bakterií. Zároveň zajišťuje membránově vázané funkce a děje, které jinde nemohou probíhat. Je sídlem dýchacích enzymů, systému oxidační fosforylace, enzymů syntézy a hydrolýzy fosfolipidů, na membráně je situován aparát fotosyntézy, ATP-asa i transportní proteiny, dochází zde k dokončení syntézy a transportu složek buněčné stěny a pouzdrových obalů a v membráně je také zakotven bičík. Složení cytoplazmatické membrány je závislé na bakteriálním druhu, ale i na podmínkách okolního prostředí [2,7].

2.2.1 Chemické složení bakteriální cytoplazmatické membrány

Strukturní základ cytoplazmatické membrány tvoří fosfolipidová dvojvrstva s periferními a integrálními proteiny, které mohou do této dvojvrstvy vstupovat z obou stran. Jednotlivé molekuly lipidů se fosfolipidovou dvojvrstvou pohybují příčně a navzájem si vyměňují svá místa. Membrána se tak chová jako dvojrozměrná tekutina, což je zásadní pro její správnou funkci, tedy pro její flexibilitu a nepropustnost pro vysoce polární molekuly [8,9].

Proteiny interagující s fosfolipidovou dvojvrstvou bývají dvojího charakteru: **proteiny periferní**, které jsou v cytozolu transportovány k hydrofilní části povrchu membrány, na kterou se vážou působením slabých elektrostatických sil, a **proteiny integrální**, které pronikají lipidovou dvojvrstvou, v níž jsou hydrofobně vázány. Tyto proteiny pak reagují s okolím třemi způsoby: vnější částí proteinu jsou vystaveny hydrofilnímu prostředí, kde interagují s vodou, rozpouštědly, ionty a ve vodě rozpustnými proteiny. Další část proteinu je exponována hydrofobně-hydrofilnímu rozhraní a zbytek proteinu je ponořen do hydrofobního vnitřku membrány [10,11]. Do jaké míry daný protein proniká do lipidové fáze, je podmíněno sekvencí aminokyselin a rozmístěním nepolárních aminokyselinových zbytků na jeho povrchu [8].

Existuje mnoho způsobů, jak mohou lipidy ovlivnit strukturu a funkci samotných proteinů a tedy i buněčnou funkci. Jsou to zejména vlastnosti a uspořádání lipidů (tekutost, tloušťka, tvar) a specifické interakce protein-lipid, které jsou závislé na chemické a strukturní stavbě lipidu (polární hlavička, glycerolová páteř, délka uhlovodíkového řetězce, míra nenasycenosti, chiralita, ionizace a chelatační vlastnosti) [11].

Zatímco integrální proteiny mohou být od fosfolipidové dvojvrstvy odděleny pouze jejím narušením, periferní proteiny lze z membrány uvolnit poměrně mírnými extrakčními postupy, které přerušují pouze interakce typu protein-protein, ale fosfolipidovou dvojvrstvu zanechávají netknutou. Užívá se např. přidavku nízké koncentrace neiontových detergentů či chalátů nebo zvýšení iontové síly [9].

Proteiny procházející dvojvrstvou buď úplně nebo částečně, vytvářejí model tekuté mozaiky [12]. Míra tekutosti dvojné vrstvy při dané teplotě závisí na fosfolipidech, ze kterých se skládá, obzvláště pak záleží na charakteru uhlovodíkových řetězců. Čím těsněji a pravidelněji bude řetězec sbalen, tím

bude dvojná vrstva viskóznější a tedy méně tekutá. Toto je naprosto zásadní pro buněčnou signalizaci, neboť v případě větší tekutosti mohou membránové proteiny rychle a snadno v obou směrech laterálně difundovat a vzájemně tak interagovat [9].

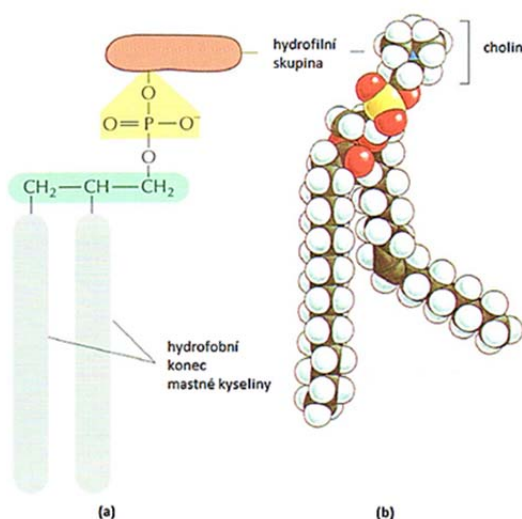
V cytoplazmatické membráně *Bacillus subtilis* bylo zjištěno, že obsahuje proteiny (62 %), RNA (22 %) a lipidy (16 %). Analýza membránových lipidů dále odhalila přítomnost fosfolipidů (75 %), neutrálních lipidů (10 %) a přítomnost diglukosyl diglyceridu [13].

2.2.2 Fosfolipidy bakteriální membrány *B. subtilis*

Fosfolipidy, tvořící biologické membrány, patří k nepostradatelným a zároveň dominantním komponentám, které jsou nezbytné pro jejich správnou funkci. Nejvíce zastoupenými fosfolipidy, které byly identifikovány v cytoplazmatické membráně *B. subtilis*, jsou: fosfatidylglycerol (PG), fosfatidylethanolamin (PE), difosfatidylglycerol (kariolipin, CL) a fosfatidylserin (PS). V menší míře jsou zastoupeny: kyselina fosfatidová (PA) a lysylfosfatidylglycerol (lysylPG). Při fyziologickém pH nese PE obojetný iont (kladný i záporný) a PG, CL a PS nesou záporný náboj [14].

2.2.3 Struktura fosfolipidů

Fosfolipidy jsou amfipatické molekuly, které v poloze C₃ *sn*-glycerolu obsahují polární fosforylovou hlavičku odvozenou od alkoholu, zatímco poloha C₁ a C₂ *sn*-glycerolu je esterifikována dlouhým řetězcem mastných kyselin (**Obr. 2-2**) [11].



Obrázek 2-2 (a) Obecný vzorec fosfolipidu, (b) kalotový model molekuly fosfolipidu fosfatidylcholinu¹ [9]

Polární hlavičky díky obsahu nabitých atomů či polárních skupin, které mohou vytvářet elektrostatické vazby nebo vodíkové můstky s molekulami vody, se ve vodě ochotně rozpouštějí, zatímco nepolární část fosfolipidu je ve vodě nerozpustná, neboť atomy či molekuly jsou nenabité a nepolární, a proto nemohou vytvářet s molekulami vody můstky. U fosfolipidů je dost často patrné, že se v poloze C₁ vyskytuje nasycená mastná kyselina a v poloze C₂ nenasycená mastná kyselina [9].

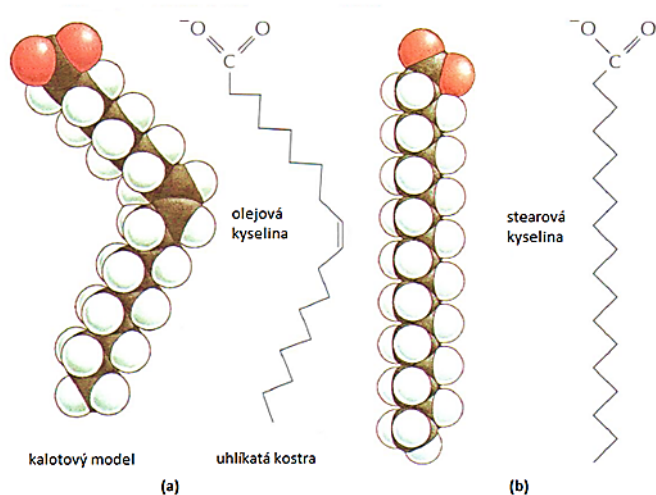
¹ Fosforylovaná polární skupina (cholin) se pojí přes fosfátový zbytek ke glycerolu, který je spojen dvěma uhlovodíkovými řetězci, jež tvoří hydrofobní část molekuly. Uhlovodíkové řetězce jsou tvořeny acyly mastných kyselin, které jsou připojeny přes atomy kyslíku ke glycerolu.

Nejjednodušším fosfolipidem je kyselina fosfatidová, která se však u *B. subtilis* vyskytuje ve stopovém množství, protože slouží jako prekurzor pro ostatní syntetizované fosfolipidy (viz 2.2.5).

2.2.4 Mastné kyseliny bakteriálních fosfolipidů

Mastné kyseliny jsou stavebními kameny fosfolipidů, ve kterých tvoří nepolární část jejich molekuly. Membránové mastné kyseliny lze rozdělit do dvou hlavních tříd podle jejich biosyntetických vztahů. Buď obsahují rovné nebo větvené řetězce, které se vyskytují v *iso*- a *anteiso*-konformaci. *Iso*- a *anteiso*-konformace se liší polohou methylové skupiny, která substituují vodík na uhlíkovém atomu alifatického řetězce. V případě *iso*-konformace je methylová skupina substituována na předposlední uhlíkový atom alifatického řetězce, zatímco při *anteiso*-konformaci může substituovat jiný než předposlední uhlíkový atom [15]. S rostoucím obsahem větvených nebo nenasycených alifatických řetězců a s jejich klesající délkou se zvyšuje fluidita fosfolipidové dvojvrstvy [11]. Pro bakterie je typické, že u nich převládají nasycené mastné kyseliny nad nenasycenými (**Obr. 2-3**), podobně jako rovné řetězce nad větvenými [15]. Dvojná vazba, které se vyskytují v nenasycených řetězcích mastných kyselin bakteriálních membránových fosfolipidů, jsou často *cis* izomery. V průběhu izomerizace nedochází k posunu dvojná vazby v řetězci a enzym, který tento proces katalyzuje, je *cis* → *trans* isomerasa [16].

Výskyt větvených mastných kyselin u bakterií byl poprvé popsán u *B. subtilis*, proto z tohoto pohledu také patří k nejvíce studovaným bakteriím [15]. V rámci studií byl zjištěn obsah až 90 % větvených mastných kyselin u této bakterie, zejména pak *iso*-C₁₄, *iso*-C₁₅, *iso*-C₁₆, *iso*-C₁₇, *anteiso*-C₁₅ a *anteiso*-C₁₇, z nichž *anteiso*-C_{15:0}, *iso*-C_{17:0} a *anteiso*-C_{17:0} patří k majoritním [14].



Obrázek 2-3 Vzorec struktury nenasycené (a) a nasycené (b) mastné kyseliny² [9]

² (a) Kyselina olejová (při pH 7), nenasycená mastná kyselina s 18 uhlíkovými atomy a navíc s jednou dvojnou vazbou v *cis* izomeraci. Dvojná vazba neumožňuje rotaci. (b) Kyselina stearová (při pH 7), plně nasycená mastná kyselina také s 18 uhlíkovými atomy.

2.2.5 Biosyntéza fosfolipidů

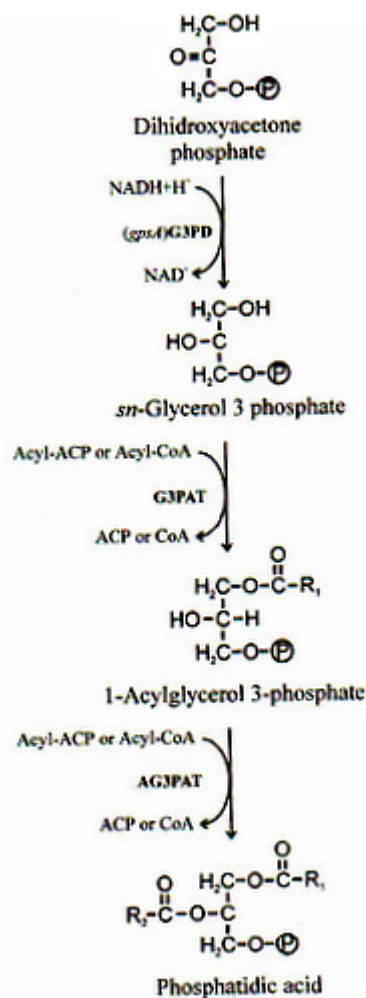
Studie metabolismu fosfolipidů ukázaly, že dráhy pro syntézu majoritních fosfolipidů *B. subtilis* jsou velmi podobné těm u *Escherichia coli*. Fosfolipidy jsou syntetizovány v cytoplazmatické membráně působením integrálních proteinů (katalytické enzymy), které bývají často orientovány do cytoplazmy. K biosyntéze fosfolipidů může docházet až poté, co je nasyntetizována kyselina fosfatidová (**Obr. 2-4**), neboť právě tato komponenta cytoplazmatické membrány slouží jako prekurzor pro všechny syntetizované fosfolipidy, a také proto není její zastoupení příliš velké.

Biosyntéza kyseliny fosfatidové se skládá ze tří po sobě jdoucích reakcí, přičemž u dvou dochází k acylaci, tedy k zabudování karboxylové skupiny do glycerolu. Celý proces začíná přeměnou dihydroxyacetonfosfátu, který vzniká glykolýzou, na *sn*-glycerol-3-fosfát. Tuto přeměnu katalyzuje enzym glycerol-3-fosfát dehydrogenasa (G3PD). *Sn*-glycerol-3-fosfát následně podléhá první acylaci za katalýzy glycerol-3-fosfát acetyltransferasy (G3PAT), přičemž karboxylová skupina je zabudována do polohy C₁ *sn*-glycerolu. Ihned následuje druhá acylace, jejímž výsledkem je vznik kyseliny fosfatidové. Při této reakci, katalyzované enzymem 1-acylglycerol-3-fosfát acyltransferasou (AG3PAT), dochází k zabudování karboxylové skupiny do polohy C₂ *sn*-glycerolu [17, 18, 19].

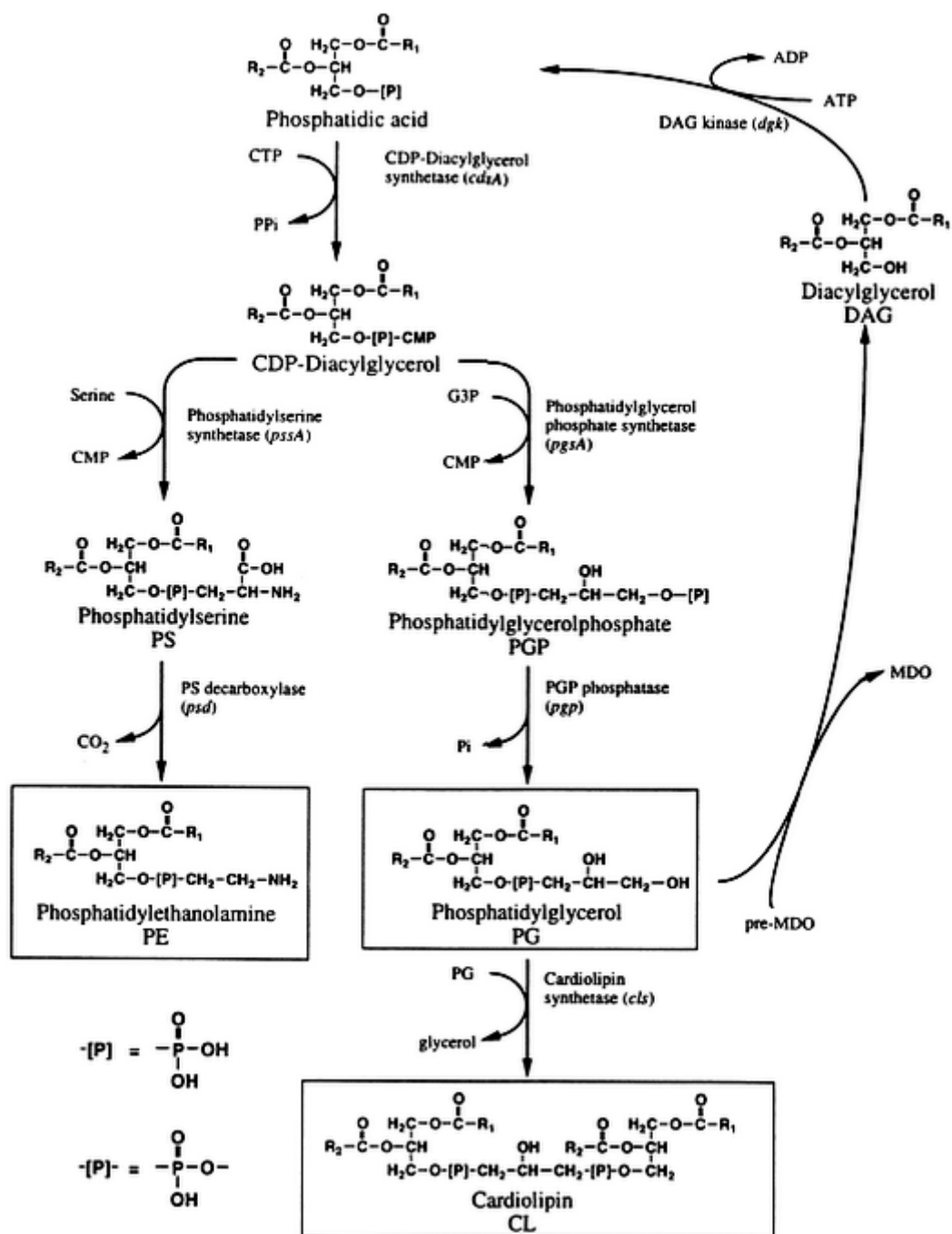
Vznikající PA je dále účinně přeměňována působením enzymu CDP-diacylglycerol syntetasy (*cdsA*) na CDP-diacylglycerol, z něhož na jedné straně vznikají aminofosfolipidy fosfatidylserin (PS) a fosfatidylethanolamin (PE) a na straně druhé kyselé fosfolipidy fosfatidylglycerol (PG) a kardiolipin (CL) (**Obr. 2-5**).

Fosfatidylethanolamin vzniká z fosfatidylserinu (PS), který se u *B. subtilis* také vyskytuje, byť v menší míře. Zatímco přeměnu CDP-diacylglycerolu katalyzuje fosfatidylserin syntetasa (*pssA*) za účasti aminokyseliny serinu, transformace PS na PE se účastní enzym fosfatidylserin dekarboxylasa (*psd*). U *B. subtilis* a jiných gram-pozitivních bakterií je enzym fosfatidylserin syntetasa vázán velmi pevně k cytoplazmatické membráně, aby byl aktivní.

V případě vzniku kyselých fosfolipidů začíná syntéza vznikem intermediátu fosfatidylglycerolfosfátu (PGP), který je katalyzován fosfatidylglycerolfosfát syntetasou (*pgsA*). Takto vzniklý meziprodukt podléhá fosforylaci za katalýzy fosfatidylglycerolfosfát fosfatasou (*pgp*), čímž vzniká další majoritní fosfolipid – PG, a dále diacylglycerol (DAG), který je působením diacylglycerol kinasy (*dgk*) recyklován fosfolipidovou metabolickou drahou zpět na kyselinu fosfatidovou. Kondenzací dvou fosfatidylglycerolových molekul, za uvolnění jedné glycerolové skupiny a za katalýzy kardiolipin syntetasou (*cls*), vzniká další kyselý fosfolipid – CL [18, 19, 20, 21].



Obrázek 2-4 Biosyntéza kyseliny fosfatidové (PA) [18]



Obrázek 2-5 Biosyntetické dráhy vedoucí k majoritním fosfolipidovým třídám *E. coli* [20].

2.2.6 Faktory ovlivňující složení cytoplazmatické membrány

Fosfolipidové složení bývá velmi proměnlivé, protože je ovlivněno celou řadou podmínek během růstu, např. kultivační teplotou, fází růstu, aciditou média, přísunem kyslíku atd. Zajištěním optimálních podmínek v průběhu buněčného růstu je zaručeno stálé fosfolipidové složení a tedy správná funkce membrány. Na fosfolipidové složení má velký vliv např. teplota prostředí, která zásadně ovlivňuje poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin a tedy i stupeň fluidity membrány [15,16]. S jejím poklesem dochází k desaturaci mastných kyselin a membránových lipidů a zvyšuje se podíl *anteiso*-větvených mastných kyselin [9,17].

Při identifikaci a kvantifikaci jednotlivých fosfolipidových tříd je proto nezbytné dbát na již zmíněné faktory, které složení ovlivňují.

2.3 Metody analýzy mastných kyselin fosfolipidů

2.3.1 Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie (Gas Chromatography, GC) se v souvislosti s fosfolipidy primárně používá k identifikaci mastných kyselin v bakteriálních lipidech na základě jejich retenčních charakteristik. Standardní postup při identifikaci bakteriálních mastných kyselin zahrnuje tři techniky, které jsou aplikovány v tomto pořadí: tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC) pro oddělení jednotlivých tříd, následuje plynová chromatografie pro individuální separaci a předběžnou identifikaci a hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) pro strukturální identifikaci. Většina mastných kyselin, vyskytujících se ve fosfolipidech *B. subtilis*, jsou větvené *iso*- a *anteiso*-mastné kyseliny. Separace *iso*-kyselin od *anteiso*-kyselin se stejným počtem uhlíků (např. *iso*-C₁₅ a *anteiso*-C₁₅) může být poměrně obtížná, proto se většinou používají delší separační kolony. Plynová chromatografie mimo jiné slouží i k určení poloh dvojných vazeb nebo funkčních skupin na uhlovodíkovém řetězci. [14,15].

Aby mohly být mastné kyseliny analyzovány, je nezbytná jejich izolace z fosfolipidu. Zároveň musí analyt splňovat podmínky pro stanovení plynovou chromatografií, tj. podmínku těkavosti a dostatečné tepelné stability, neboť molekuly s velkou molekulovou hmotností a polárními skupinami nejsou díky nízké těkavosti pro GC vhodné. Touto úpravou se rozumí derivatizace (transesterifikace) složených lipidů, při níž dochází k převedení mastných kyselin na methylestery s cílem určit celkové zastoupení mastných kyselin ve vzorcích. Existuje mnoho derivatizačních činidel, např. tetramethylamonium hydroxid, kyselina sírová (2%) v methanolu, či methoxid sodný v methanolu. K separaci většinou dochází na křemenných kapilárních kolonách s nepolárními, mírně polárními, nebo zcela polárními stacionárními fázemi. Polarita stacionární fáze zásadně ovlivňuje retenční pořadí esterů mastných kyselin s různým počtem dvojných vazeb při stejné délce uhlovodíkového řetězce. Pokud má stacionární fáze nepolární charakter, budou kolonu jako první opouštět více nenasycené estery, v případě polární fáze bude retenční pořadí opačné.

Aby byla během analýzy zajištěna vysoká separační schopnost složitějších směsí a citlivost metody, bývá plynová chromatografie kombinována s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Lze ji tedy využít jak pro kvalitativní, tak kvantitativní analýzu.

Postupy přípravy methylesterů mastných kyselin se v literatuře liší a existuje mnoho verzí, jak efektivně tyto nepolární části z fosfolipidů získat. Podrobný postup byl např. popsán již v r. 1971 R.L. Glassem. Tento postup byl nedávno realizován a zároveň optimalizován v rámci dizertační práce RNDr. Gabriely Seydlové, Ph.D. z roku 2010. Při přípravě methylesterů mastných kyselin je nejprve potřeba přidat ke vzorku roztok methanolátu sodného, který se připravuje rozpuštěním této látky ve směsi bezvodého methanolu a benzenu, a dále se přidává fenolftalein (FF). Jakmile se roztok methanolátu sodného přidá ke vzorku, nechá se 5 minut odstát a poté se zneutralizuje roztokem bezvodé HCl do vymizení zabarvení FF. Následuje přidavek acetylchloridu, opět se nechá 5 minut stát a nakonec následuje extrakce pentanem. Tuto směs je třeba velmi dobře promíchat, nejlépe na vortexu, čímž dojde k extrakci a ke vzniku dvou kapalných fází, jejichž vznik se podpoří nepatrným přídavkem destilované vody. Jakmile dojde k rozdělení obou fází, odebere se horní organická fáze do malé skleněné vialky, neboť právě tato fáze obsahuje vzorek methylesterů mastných kyselin. Extrakci

je dobré několikrát opakovat, aby byla co nejúčinnější. Následuje odpaření rozpouštědla a rozpuštění v heptanu. Takto získaný vzorek je následně připraven k analýze na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí (GC-MS) [22, 23].

Spodní vodná část po extrakci, která obsahuje polární části fosfolipidů, v tomto případě slouží jako odpad, neboť dosud nebyla nalezena taková analytická metoda, která by umožňovala její stanovení.

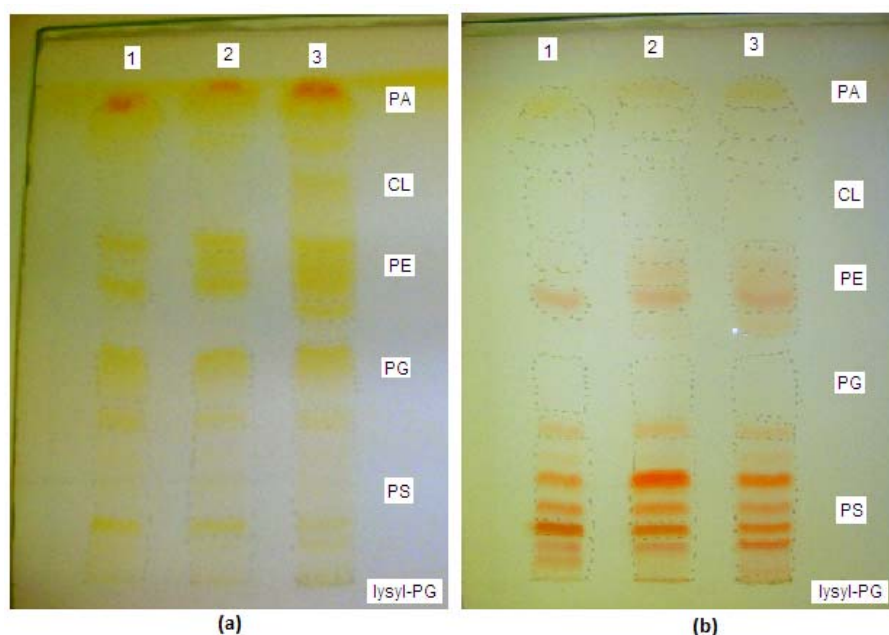
2.4 Metody analýzy fosfolipidů a jejich polárních částí

2.4.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC) je analytická separační metoda založená na dělení látek na styku dvou fází – mobilní a stacionární. Pro vzájemné rozlišení fosfolipidů se běžně používá jako mobilní fáze směs rozpouštědel o různé polaritě: chloroform-methanol-voda (65:25:4, v/v/v). Jako stacionární fáze slouží silikagel (gel kyseliny křemičité, $SiO_2 \cdot xH_2O$), který je rovnoměrně nanášen ve formě suspenze na skleněnou desku (nejčastější rozměry desky jsou 20x20 cm, a tloušťka vrstvy 0,25 mm). Silikagel na svém povrchu obsahuje volné polární –OH skupiny a působením vodíkových vazeb je schopen vázat vzorky fosfolipidů. Zadržovány jsou přednostně zásadité fosfolipidy, neboť silikagel má kyselý charakter.

Kvalitativní analýza

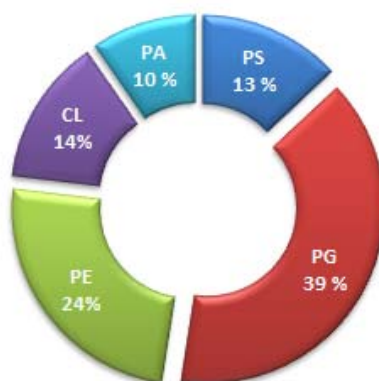
Výhodou chromatografické desky je její velikost, neboť umožňuje nanesení a rozlišení až deseti složek. Aby však došlo ke správnému rozlišení a analýza vedla k optimálním výsledkům, je nezbytné dodržovat určité a prověřené postupy. Před započítím nanášení vzorků bývá běžnou praxí tzv. aktivace desky, jež spočívá ve vysušení v horkovzdušné sušárně 1 hodinu při 110 °C. V minulosti bylo již prokázáno, že má aktivace desky své opodstatnění, neboť nedefinovaný obsah vody ovlivňovaný vzdušnou vlhkostí může velmi nepříznivě ovlivňovat kvalitu separace jednotlivých zón analytů a reprodukovatelnost. Suchá lipidová frakce bývá obvykle rozpuštěna v chloroformu a nanášena mikrostříkačkou na řádně vyznačené stopy, obvykle pásy, po malých dílech, aby docházelo k průběžnému odpařování rozpouštědla. Nanášení vzorků musí být provedeno co nejrychleji, neboť silikagel absorbuje vzdušnou vlhkost a efekt aktivace desky se tak s časem snižuje. Po nanesení vzorků je deska vložena do chromatografické komory nasycené parami mobilní fáze tak, aby tzv. start s nanesenými vzorky byl v mobilní fázi ponořen. Vyvíjení bývá uspořádáno vzestupně. Jak mobilní fáze vzlíná póry stacionární fáze, vzniká tzv. kotvená fáze, která je obohacená o polární složky ze vzlínající směsi (methanol a voda). V místě styku mobilní fáze s fosfolipidy dochází k jejich okamžitému rozpuštění a unášení. Protože se mobilní fáze skládá z rozpouštědel o různé polaritě, je evidentní, že nejméně polární fosfolipidy budou mít větší tendenci v ní zůstat, budou tedy postupovat s čelem mobilní fáze dále, zatímco více polární fosfolipidy se budou v kotvené fázi rozpouštět a tedy zaostávat. Po ukončení analýzy a vytěkání mobilní fáze je nutná detekce (vizualizace) separovaných zón, neboť fosfolipidy neposkytují barevné zabarvení. Existuje celá řada detekčních činidel, která s analyty reagují a poskytují barevné produkty. Běžnými činidly bývají např. páry jodu, jako nespecifického činidla reagujícího v místě výskytu mastných kyselin za žlutého zabarvení, a dále 0,2% roztok ninhydrinu, kterým se deska nastříká a nechá „zahřát“ v horkovzdušné sušárně vytemperované na 105 °C po dobu 30 minut. Dochází tak k vizualizaci a lokalizaci fosfolipidů obsahujících v polárních částech aminoskupiny, za vzniku růžovo-oranžového zabarvení (**Obr. 2-6**).



Obrázek 2-6 Kvalitativní analýza fosfolipidů *B. subtilis* ATCC 21332 metodou TLC: (a) vizualizace parami jódu, (b) vizualizace 0,2% ninhydrinem; Lysyl-PG – lysylfosfatidylglycerol, PS – fosfatidylserin, PG – fosfatidylglycerol, PE – fosfatidylethanolamin, CL – kardiolipin, PA – kyselina fosfatidová [24].

Kvantitativní stanovení

Množství jednotlivých tříd fosfolipidů se zjišťuje nepřímou metodou. Stanovení spočívá ve vyškrábání skvrny silikagelu obsahujícího analyt do zkumavky a mineralizaci vodným rozpouštědlem, za účelem převedení organického fosfátu na anorganický. K tomuto účelu slouží jako vodné rozpouštědlo 70% $HClO_4$, která se ponechá reagovat (inkubovat) se vzorkem 20 minut při 180 °C. Při této mineralizaci zůstává silikagel zcela nerozpuštěný. Následuje přidavek destilované vody, molybdenanu amonného (2,5%, w/v) a kyseliny askorbové (10%, w/v) jako redukčního činidla. Mezi přísady každého činidla je nezbytné vše řádně promíchat a následně povařit při 100 °C po dobu 5 minut. Reakcí vzniká typické modrofialové zabarvení, tzv. fosfomolybdenová modř, jehož intenzita je úměrná obsahu fosforu ve vzorku. Obsah analytu se stanovuje spektrofotometricky změřením absorbance při vlnové délce 820 nm. Kvůli výpočtu množství fosforylovaných látek se proměřuje kalibrační řada za použití standardu K_2HPO_4 . Skutečné množství fosforylovaných látek ve vzorcích je poté vypočítáno z příslušné rovnice kalibrační přímky [25, 26, 27, 28].



Obrázek 2-7 Fosfolipidové zastoupení v *Bacillus subtilis* ATCC 21332 zjištěné metodou TLC: PE – fosfatidylethanolamin, CL – kardiolipin, PA – kyselina fosfatidová, PS – fosfatidylserin, PG – fosfatidylglycerol [24].

2.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High - Performance Liquid Chromatography, HPLC) je významnou a úspěšně používanou analytickou separační metodou, jejíž podstatou je distribuce složek směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi – mobilní a stacionární. Vysokou účinnost ovlivňuje zejména náplň chromatografické kolony – stacionární fáze. Složením mobilní fáze lze ovlivňovat separaci, což s sebou nese náročnější instrumentaci a složitější mechanismus separace. U směsi látek s podobnými elučními parametry se používá izokratická eluce jedinou mobilní fází, jejíž složení se nemění. U směsi látek s rozdílnými elučními parametry nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, proto se využívá gradientové eluce založené na přimíchávání jedné mobilní fáze s větším elučním účinkem k druhé mobilní fázi s menším elučním účinkem, čímž se vytvoří koncentrační gradient. Způsobem gradientové eluce lze stanovit i fosfolipidy. Zatímco separace a stanovení fosforylovaných sloučenin se v odborné literatuře až na výjimky neobjevuje, u stanovení celých fosfolipidů je tomu naopak [28,29,30].

Nejpoužívanější metodou pro stanovení fosfolipidů je kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí spojená s elektrosprejovou ionizací (High - Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionization - Mass Spectrometry, HPLC-ESI-MS). Tato metoda byla např. využita k identifikaci a stanovení fosfolipidů kyseliny fosfatidové (PA), fosfatidylethanolaminu (PE), fosfatidylglycerolu (PG), fosfatidylserinu (PS), fosfatidylcholinu (PC) a fosfatidylinositolu (PI) v řepkovém, olivovém, mandlovém a slunečnicovém oleji. K separaci fosfolipidů byla použita diolová kolona. U gradientové eluce byla použita binární směs rozpouštědel A: hexan-2-propanol-kyselina octová-triethylamin (82:17:1:0,08, v/v/v/v) a směs B: 2-propanol-voda-kyselina octová-triethylamin (85:14:1:0,08 v/v/v/v). Gradient začínal na 5 % směsi B a jeho procentuální podíl byl plynule zvyšován až na 80 % v průběhu 25 minut. Toto složení bylo udržováno 1 minutu a poté vráceno zpět na 5 % B po dobu 10 minut a poté udržováno na 5 % další 4 minuty. Celková doba byla tedy při konstantním průtoku 1 ml/min 40 minut. Fosfolipidové třídy byly identifikovány v tomto pořadí podle retenčních časů: PA, PE, PG, PC, PS, PI [31, 32].

Další možnou variantou pro úspěšné stanovení fosfolipidů je kapalinová chromatografie s evaporativním detektorem rozptylu světla (High - Performance Liquid Chromatography – Evaporative Light Scattering Detector, HPLC-ELSD), u které lze také použít gradientovou eluci. Stacionární fáze může být normální i reverzní. Jako normální fáze se nejčastěji používá silikagel (-Si-OH) nebo fáze s chemicky vázanými skupinami, především diol $-(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$. Příkladem reverzní fáze je fáze s chemicky vázanými skupinami, např. C8 a C18 (oktadecyl silica – ODS). V praxi bývá využívána ternární mobilní fáze A: hexan-tetrahydrofuran (99:1 v/v), B: 2-propanol-chloroform-kyselina octová (82:20:0,01 v/v/v) a C: 2-propanol-voda-triethylamin (47:47:6 v/v/v). V průběhu 70 minut dochází k plynulé změně gradientu mobilní fáze dle **Tab. 2-1** při konstantním průtoku 0,5 ml/min [33,34].

Tabulka 2-1 Ternární gradientový systém

Čas	0	5	10	15	33	55	60	65	70
A (%)	100	95	85	40	40	40	40	100	100
B (%)	0	5	15	60	51	51	60	0	0
C (%)	0	0	0	0	9	9	0	0	0

2.4.3 Nukleární magnetická rezonance

Jaderná neboli nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) je, na rozdíl od ostatních zde uvedených analytických metod, spektrometrickou analytickou metodou, která se používá k určování struktury sloučenin, především organických, čímž se stala nezbytnou součástí při studiu sledování průběhu reakcí a ověřování struktury reakčních produktů při syntéze látek. Díky postupnému zdokonalování metody (např. zvýšením intenzity magnetického pole a tím i citlivosti a rozlišení) lze touto metodou odhalit i struktury velmi komplikovaných a složitých sloučenin, např. sekundární a terciární struktury biopolymerů, a studovat vzájemné interakce, což je však také časově náročnější, než u jednodušších sloučenin.

Těžiště metody NMR spočívá tedy v určování struktury sloučenin a je založeno na pozorování jader vodíku. Typicky se zabývá potvrzením či vyloučením konkrétní sloučeniny vzniklé po chemické reakci, méně často pak ve směsi. Vzhledem k tomu, že intenzita odezvy je přímo úměrná koncentraci, lze ji využít i ke kvantifikaci (po vhodné kalibraci). V analytické chemii je však méně běžnou metodou zejména kvůli nízké citlivosti (je potřeba řádově mM koncentrací) a vysoké ceně přístroje.

Každá sloučenina má za konkrétních experimentálních podmínek charakteristická spektra obsahující poměrně úzké a dobře rozlišitelné signály. Analýzou pozic, intenzity a jemné struktury jednotlivých rezonancí (popřípadě využitím korelačních technik a NMR spekter jiných jader) lze provést její důkaz, či posléze semikvantitativní stanovení.

Metoda NMR se také využívá k identifikaci fosfolipidů. Velkou výhodou oproti jiným analytickým metodám je, že provedení analýzy není tak pracné, protože nezahrnuje různé separační a derivatizační kroky. Časová náročnost metody je přímo závislá na množství analyzované sloučeniny a dalších parametrech, např. citlivosti a homogenitě magnetického pole (tj. rezonanční frekvence přístroje).

Ze všech jader přítomných ve fosfolipidech je nejvíce používán při studiu fosfolipidů fosfor (kromě protonu). Jednou z hlavních předností ^{31}P jádra je jeho srovnatelně vysoká citlivost a jednoduché experimentální požadavky na záznam ^{31}P NMR spekter. Několik důležitých vlastností P-31 jader a srovnání s jinými jádry jsou uvedeny v **Tab. 2-2**. Z tabulky je patrné, že má fosfor téměř nejvyšší gyromagnetický poměr, který v kombinaci s jeho vysokým výskytem v přírodě vede k dobré detekovatelnosti, a to i při nižším magnetickém poli [35,36].

Tabulka 2-2 Vlastnosti ^{31}P jádra v porovnání s ostatními NMR-aktivními izotopy. Uvažována jsou pouze jádra vyskytující se ve fosfolipidech [36].

Jádro	Spin	Zastoupení v přírodě	Gyromagnetický poměr ³	Frekvence	Relativní senzitivita
^1H	1/2	99,86	26,75	100	5680
^{13}C	1/2	1,11	6,73	25,15	1
^{14}N	1	99,63	1,93	7,22	5,7
^{15}N	1/2	0,37	-2,71	10,14	0,02
^{17}O	5/2	0,037	-3,63	13,54	0,06
^{31}P	1/2	100	10,84	40,48	377

³ Gyromagnetický poměr je poměr mezi magnetickým momentem a momentem hybnosti částice či systému.

Zatímco se v případě jiných sloučenin běžně používá jedno rozpouštědlo, kvůli amfipatickému charakteru fosfolipidů, je pro kvalitní ^{31}P NMR spektra nutné použít směs rozpouštědel. Při různých experimentech se osvědčila směs deuterovaných rozpouštědel: chloroform (CD_3Cl)-methanol (CD_3OD)-nasycený vodný roztok EDTA (125:8:1, v/v/v). Některé další odborné publikace se zmiňují také o přidavku soli žlučové kyseliny, např. cholátu sodném ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_5$), jež se přidávala oproti fosfolipidům v několikanásobném přebytku za současné tvorby micel v polární fázi. Podle uvedených výsledků docházelo ke zvýšení kvality spekter ve smyslu užších a lépe rozlišitelných signálů. Jako referenční látka sloužila 85% H_3PO_4 [36,37].

Jestliže se vzorek pečlivě připraví, mohou být individuální třídy fosfolipidů pomocí ^{31}P NMR snadno rozlišeny. Navíc může být v rámci jednoho experimentu určeno i složení mastných kyselin daného fosfolipidu [36].

2.4.4 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) je elektromigrační separační metoda, která spočívá v migraci iontů vlivem elektrického pole. Lze jí využít pro separaci organických i anorganických látek, které jsou v elektrickém poli kladně či záporně nabitě. Přívlastek *kapilární* naznačuje, že k separaci dochází v kapiláře, jež bývá většinou křemenná či teflonová. Díky malému vnitřnímu průměru této kapiláry může být na elektrody vkládáno vysoké napětí a dále dochází k malým spotřebám vzorků a analytů. Výsledkem této metody je krátká doba experimentu doprovázená vysokou účinností. Z tohoto důvodu se někdy této metodě přiřazuje přívlastek *vysokoúčinná kapilární elektroforéza* (High-performance capillary electrophoresis, HPCE) [28].

Kapilární elektroforéza si získala v posledních letech velké uznání a stala se v laboratořích velmi využívanou separační technikou. V současné době je úspěšně používána např. pro analýzu škodlivých látek životního prostředí, léčiv, rostlinných extraktů, anorganických iontů, organických kyselin, oligomerů atd. Čím dál větší zájem je v poslední době také spatřován v lipidech tvořících různorodou skupinu přirozeně se vyskytujících organických sloučenin, jako jsou tuky, oleje, vosky, steroly, vitaminy, fosfolipidy atd. V této studii byla CZE používána výhradně ke stanovení fosfolipidů a jejich polárních částí, tj. fosforylovaných sloučenin [38,39].

Zatímco se v literatuře vyskytuje řada odborných publikací týkajících se analýzy fosfolipidů, existuje jen minimální množství publikací odkazujících se na stanovení polárních částí těchto lipofilních látek s neúplnými popisy postupů během experimentů. Zásadní rozdíl v analýze této skupiny látek je v používaných rozpouštědlech. Vzhledem k polárnímu charakteru části fosfolipidu je patrné, že bude analýza probíhat ve vodném prostředí, zatímco díky lipofilnímu charakteru celého fosfolipidu bude analýza probíhat buď v částečně, nebo ve zcela nevodném prostředí.

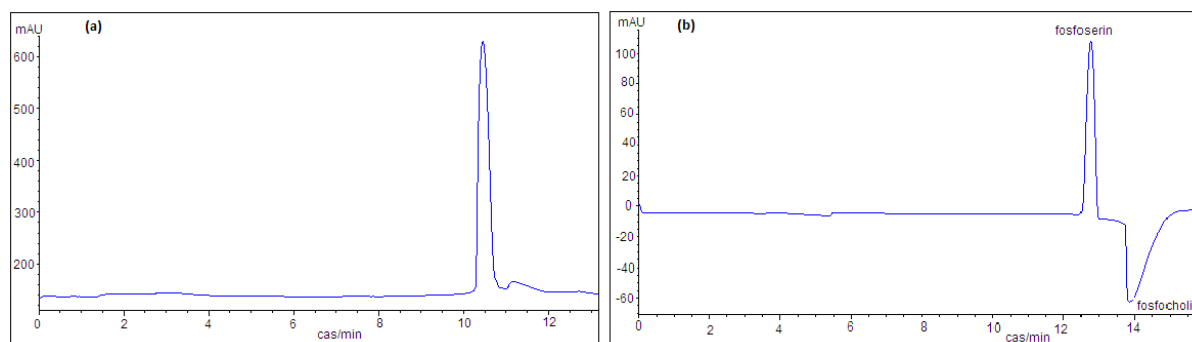
Fosforylované sloučeniny byly v minulosti stanovovány několika způsoby, jak např. dokazuje bakalářská práce [24]. K analýzám byly využívány roztoky těchto standardů: fosfocholin, fosfoserin a fosfoglycerol o koncentraci 0,01 M. Při experimentech byly používány pufrы o různém pH včetně bazického roztoku NaOH o pH 11,5 (**Tab. 2-3**).

Tabulka 2-3 Seznam použitých separačních elektrolytů při analýzách vzorků fosforylovaných sloučenin [24]

Separační elektrolyt	Složka	c/mol.l ⁻¹	pH
Mravenčanový	kys. mravenčí	0,01	3,5
Acetátový	kys. octová		4,7
Citrátový	kys. citronová		6,0
Tris	tris(hydroxymethyl)methylamin		8,0
Borátový	tetraboritan sodný		9,1
NaOH	hydroxid sodný		11,5

Měření byla prováděna na křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm a efektivní délce 54,5 cm. K detekci byl používán UV/VIS spektrofotometrický DAD detektor (Diode-array detector, DAD). Pro dosažení maximální citlivosti byla proměřena absorpční spektra jednotlivých standardů. Zóny všech těchto analytů byly detekovány v oblasti vlnových délek 196 – 211 nm odpovídajících jejich absorpčním maximům.

Zmiňovaná práce se nejprve věnovala přímé detekci s přidavkem thiomočoviny (1 mg/ml) jako markeru EOF a proměřeny byly všechny separační elektrolyty (publikované výsledky viz **Obr. 2-8**). Protože však byla jednotlivá měření doprovázena problémy, které tkvěly ve velkém šumu základní linie a rozmytých a asymetrických píkách, byla vyzkoušena nepřímá detekce, jež spočívala v přidavcích chromoforů – kyseliny pyromellitové, ftalové, benzoové a p-hydroxybenzoové. Částečně pozitivních výsledků bylo dosaženo v mravenčanovém pufru s přidavkem kyseliny p-hydroxybenzoové. Podařilo se identifikovat jednotlivé analyty a směs dvou standardů fosfoserinu a fosfocholinu. Celkově se však dá říci, že tyto pokusy o stanovení fosforylovaných sloučenin vedly k neuspokojivým výsledkům [24].



Obrázek 2-8 (a) Elektroferogram fosfoserinu (0,01 mol/l) v NaOH (pH 11,5): dávkování při tlaku 50 mbar po dobu 5 s, separační napětí 25 kV, $\lambda = 211 \text{ nm}$. **(b) Elektroferogram směsi fosfoserinu a fosfocholinu (0,01 mol/l) v mravenčanovém pufru (pH 3,5):** podmínky separace stejné jako v případě (a) [24].

Zatímco byly fosforylované složky výhradně studovány za použití vodného separačního média, pro stanovení nepolárních sloučenin, tj. fosfolipidů, není tento postup příliš dobrou volbou, a proto byla vyvinuta kapalinová elektroforéza v nevodném prostředí (Nonaqueous capillary electrophoresis, NACE), která se dnes v laboratořích běžně využívá, byť s sebou může nést jistá omezení oproti klasickému provedení.

Separační médium může představovat buď jedno čisté organické rozpouštědlo, nebo směs různých organických rozpouštědel. Někdy se může k této organické fázi přidat nepatrné množství vody. K nejvíce používaným rozpouštědlům patří: methanol, acetonitril, ethanol, 1-propanol,

2-propanol a formamid, neboť neabsorbují v UV oblasti spektra, jsou komerčně a cenově dostupné a snadno se s nimi manipuluje. Přestože existuje celá řada organických rozpouštědel, ne všechna jsou vhodná pro NACE. Rozpouštědlo by mělo splňovat alespoň některý z těchto požadavků: nízká viskozita, dostatečná relativní permitivita, chemická stabilita, dobrá rozpouštěcí vlastnost, nízká těkavost, snadná dostupnost, rozumná cena, čistota a kompatibilita s instrumentálními požadavky. Celková účinnost separace závisí do značné míry na detektoru. Nejvíce používaným detektorem je spektrofotometrický UV/VIS detektor [40,41,42, 43].

Guo et al., 2005, věnovali pozornost optimalizaci metody NACE na fosfolipidových standardech a poté byly za těchto podmínek stanoveny reálné vzorky fosfolipidů izolovaných z rostlinných semen. Mezi stanovené fosfolipidy patřily PC, PE a PI. Optimalizace metody a vlastní analýza reálných vzorků byly provedeny na křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 75 μm a efektivní délky 40 cm. Analyty o koncentraci 1 mg/ml byly detekovány UV detektorem při vlnové délce 200 nm a použité separační napětí bylo 30 kV. Jako separační elektrolyt byla zvolena směs rozpouštědel acetonitril – alkohol (3:2, v/v), 0,3 % kyselina octová a 60 mM octan amonný. V rámci optimalizace bylo měněno separační napětí a dále přítomnost různých alkoholů. Ve studii byly použity alkoholy methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol a 1-oktanol. Nejlepší výsledky byly získány v separačním elektrolytu acetonitril – 2-propanol (3:2, v/v), 0,3 % kyselina octová a 60 mM octan amonný [38].

2.4.5 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) se v dnešní době řadí k instrumentům moderní bioanalýzy. Tato metoda se stala velkým přínosem v odvětvích zkoumajících např. peptidy, proteiny, nukleové kyseliny, sacharidy, farmaceutika, syntetické polymery aj., zatímco lipidům se doposud věnovalo mnohem méně pozornosti. Dříve se na lipidy pohlíželo jako na zdroje energie a obalové komponenty buněčných struktur, dnes je naopak důraz kladen na jejich význam, funkce a role, které souvisí s přenosem signálu, funkcí informační molekuly, meziproduktů a prekursorů metabolismu. Z dostupné odborné literatury vyplývá, že pokud jsou vhodně zvoleny parametry a metodika, může MALDI-TOF MS sloužit jako užitečný nástroj při stanovení fosfolipidů.

Princip stanovení spočívá v nanesení nepatrného množství vzorku v nadbytku vhodné matrice na speciální destičku, nejčastěji z nerezové oceli Po ozáření pulzním laserem (krátké nanosekundové laserové pulzy) dochází pomocí fotonů k excitaci částic matrice, což způsobuje desorpci vzorku a následnou ionizaci analytu, přičemž vznikající pseudomolekulární ionty (převážně s jedním nábojem) jsou vložem elektrického pole separovány na základě jejich doby letu v TOF MS analyzátoru. Díky malé fragmentaci analytu patří MALDI do *měkkých* ionizačních technik.

Při stanovení lipidů hraje významnou roli zejména volba matrice, neboť s vhodnou matricí poskytují poměrně silný pozitivní iontový signál. Zatímco fosfolipidy obsahující např. aminoskupiny nebo kvartérní atom dusíku (např. fosfatidylcholin) poskytují silný pozitivní iontový signál, lipidy bez vlastního náboje či aminoskupiny (např. fosfatidylinositol) se ionizují velmi problematičtě. V tom případě je potřeba matici obohatit o tzv. *dopant*, který ionizaci lipidu usnadní. Zpravidla se k tomuto účelu používají Na^+ a K^+ ionty, které bývají běžně obsaženy v biologických materiálech. Ve spektrech se jejich přítomnost projeví existencí $[\text{A}+\text{Na}]^+$, $[\text{A}+\text{K}]^+$ pseudomolekulárních iontů.

Vzhledem k molekulové hmotnosti fosfolipidů je třeba vhodně vybrat matrici. Mezi nejčastěji používané patří kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) a α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA). V případě použití kyseliny DHB se doporučuje směs analytu a matrice nechat co nejrychleji vypařit po nanesení na destičku, neboť tímto způsobem vznikají menší a více homogenní směsné krystaly.

Většina měření touto metodou probíhá v pozitivním módu, avšak u fosfolipidů je tomu přesně naopak. Vzhledem k tomu, že jsou PA, PS, PG a CL při fyziologickém pH negativně nabitě, a to i vícenásobně, poskytují intenzivní negativní iontový signál. Záporně nabitě pseudomolekulární ionty vznikají ztrátou H^+ z neutrální molekuly, čímž dochází k posunu až o 2 hmotnostní jednotky oproti pozitivním iontům. Nejproblematictější analytem bývá kyselina fosfatidová, jež bývá zastoupena ve stopovém množství, protože slouží jako prekurzor při syntéze ostatních fosfolipidových tříd a též se účastní odbourávání polárních fosfolipidů [44,45,46,47,48].

2.4.6 Shrnutí významných technik při analýzách fosfolipidů

Tabulka 2-4 - Přehled významných analytických metod pro stanovení fosfolipidů [36]

	Výhody	Nevýhody	Komentáře
TLC	<ul style="list-style-type: none"> - Není drahá - Rychlá - Velmi ověřená 	<ul style="list-style-type: none"> - Zastoupení mastných kyselin se dá ve fosfolipidu jen stěží určit - Spíše nízké rozlišení 	Používá se nejčastěji jako první krok při analýze neznámého vzorku lipidů. Často jsou nutné standardy
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - Dobře ověřená - Lze použít také pro vyšší množství fosfolipidů 	<ul style="list-style-type: none"> - Poměrně časově náročná - Spotřeba velkého množství rozpouštědel - Široce empirická 	Nejčastěji se používá jako první krok při analýze neznámých lipidů.
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Nejdůležitější technikou ve výzkumu lipidů - Dostupná vysoce automatizovaná zařízení 	<ul style="list-style-type: none"> - Nejsou detekovány lipidy, ale pouze methylestery mastných kyselin - Jsou nutné derivatizační kroky 	Velmi často se používá ke zkoumání řetězců mastných kyselin lipidů.
MALDI/ESI	<ul style="list-style-type: none"> - Detekce molekulárních iontů - Mimořádně citlivá - Nízká fragmentace 	<ul style="list-style-type: none"> - Semikvantitativní metoda - Citlivost na přítomnost nečistot - Odlišná citlivost pro fosfolipidy 	Rychle se vyvíjející metoda. ESI je také velmi využívanou metodou pro analýzu lipidů a použití se zvyšuje.
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR	<ul style="list-style-type: none"> - Detekovatelné všechny sloučeniny - Nedochází k ovlivnění iontů - Mohou být provedeny srovnávací (2D) experimenty 	<ul style="list-style-type: none"> - Nízká citlivost (^{13}C) - Nutnost použít neinteragující rozpouštědlo - Drahé zařízení 	Jednou z hlavních výhod protonové NMR je to, že může být použita v rámci podmínek <i>in vivo</i> . Je možné přímé srovnání.
^{31}P NMR	<ul style="list-style-type: none"> - Detekovatelné jsou pouze fosfolipidy - Lze rozlišit nejdůležitější fosfolipidové třídy - Dobrá citlivost 	<ul style="list-style-type: none"> - Rozlišení závisí především na experimentálních podmínkách - Drahé zařízení 	Časová náročnost na ^{31}P NMR spektra.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části celého projektu bylo pracováno se zakoupenými standardy fosfolipidů a fosforylovaných sloučenin. (**Tab. 3-1**). Během práce s těmito chemickými individui byl kladen důraz na jejich uchovávání a manipulaci, neboť v případě standardů a čistých izolátů může dojít k velmi snadné kontaminaci a chemických změnám. Z tohoto důvodu byla čistá izolovaná lipidová frakce z *B. subtilis* uchovávána v -80 °C, pevné standardy v -20 °C a již připravené kapalné vzorky při teplotě 4 °C. Veškeré použité sklo a jiné drobné laboratorní pomůcky, které byly v kontaktu s těmito látkami, byly řádně opláchnuty rozpouštědly používanými při experimentu, aby nedocházelo ke kontaminaci vzorků. Při přípravě roztoků byly standardy odvažovány na analytických váhách značky Sartorius 486 s přesností $1 \cdot 10^{-5}$ g.

Tabulka 3-1 Seznam zakoupených standardů fosfolipidů a fosforylovaných sloučenin u výrobce SIGMA-Aldrich

	Standard	Sumární vzorec ⁴	Čistota	Molekulová hmotnost M_r
Fosfolipidy	Fosfatidylglycerol 1,2-Dilenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfo- <i>rac</i> -(1-glycerol), sodná sůl (100 mg)	$C_{42}H_{78}NaO_{10}P$	>98 %	797,03
	Fosfatidylethanolamin 1,2-Dilenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoethanolamin (100 mg)	$C_{41}H_{78}NO_8P$	>97 %	744,03
	Kardiolipin , sodná sůl (25 mg)	nedeklarováno	>98 %	nedeklarováno
	Fosfatidylserin 1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfo-L-serin, sodná sůl (100 mg)	$C_{34}H_{85}NNaO_{10}P$	>70 %	701,84
Fosforylované sloučeniny	Fosfoglycerol rac-glycerol 1-fosfát, disodná sůl, hydrát (5 g)	$C_3H_7Na_2O_6P \cdot xH_2O$	>85 %	216,04
	Fosfoethanolamin o-fosforethanolamin (5 g)	$C_2H_8NO_4P$	nedeklarováno	141,06
	Fosfoserin o-fosfo-L-serin (1 g)	$C_3H_8NO_6P$	nedeklarováno	185,07

⁴ Strukturní vzorce fosfolipidů a fosforylovaných sloučenin jsou uvedeny v příloze 1-9.

3.1 Příprava reálných vzorků fosfolipidů

3.1.1 Materiál, metody, přístroje

Bakterie

Lipidová frakce byla v průběhu experimentální části izolována z bakterie *Bacillus subtilis* ATCC 21332, protože patří k nepatogenním gram-pozitivním aerobním bakteriím, které se řadí k nejvíce používaným bakteriálním druhům v laboratořích. S ohledem na kultivační teplotu patří tato bakterie k mezofilním druhům, teplotní optimum tohoto kmene je 30 °C.

Chemikálie

Bactopepton, Bacto yeast extract a Lab-Lemco powder (výrobce Oxoid), chlorid sodný výrobce Lach-Ner, vše p.a.), chloroform (výrobce PENTA, HPLC grade), 2-propanol (výrobce SIGMA – Aldrich, HPLC grade), hexan (C₆H₁₄, výrobce SIGMA – Aldrich, HPLC grade).

Roztoky

Bakterie *Bacillus subtilis* byly kultivovány v tekutém médiu – živný bujón Oxoid. Pro jeho přípravu byly naváženy tyto chemikálie: Lab-Lemco powder, 1 g, Bacto yeast extract, 2 g, Bactopepton, 5 g a NaCl, 5 g. Všechny komponenty byly společně rozpuštěny v 1 l destilované vody a následovala úprava pH na 7,0 roztokem KOH (1 M), neboť optimální hodnota pH se u *B. subtilis* pohybuje v intervalu 6,0 – 7,5. Kultivační médium bylo poté sterilizováno v autoklávu a před použitím uchovávalo v chladu při teplotě 4 °C.

Na extrakci lipidové frakce byla používána směs rozpouštědel hexan – 2-propanol (3:2, v/v).

Přístroje a pomůcky

Horkovzdušná rotační třepačka značky Gallenkamp, Schoeller Instruments (pro větší objemy) – frekvence otáček 120 rpm (rounds per minute, rpm), rotační třepačka s vytemperovanou vodní lázní značky Elpan (na menší objemy) – frekvence otáček 150 rpm, pH metr značky PRÄCI TRONIC MV 870 se skleněnou elektrodou značky THETA 90 typ HC 113, spektrofotometr Helios γ (vlnová délka 420 nm), skleněné kyvety (10 mm), vakuová rotační odparka, filtrační aparatura za sníženého tlaku, membránové filtry (Synpor č. 5, velikost pórů 0,6 μ m), centrifuga značky Hettich Zentrifugen typ ROTINA 380 R (5 min, 3 500 g, 4 °C), teflonové centrifugační zkumavky (Oak Ridge), vortex (Ika), skleněné srdcové baňky (100 ml a 25 ml), filtrační aparatura – frita se skleněným filtrem (filtry Whatman GF/C o průměru 25 mm), běžné laboratorní sklo a pomůcky.

Sterilizace

Sterilizace byla prováděna dvěma způsoby. Používané sklo bylo sterilizováno v horkovzdušné sušárně při teplotě 180 °C po dobu 1 hodiny, zatímco kultivační médium bylo sterilizováno v autoklávu (způsobem předeřháté vodní páry) při teplotě 121 °C po dobu 20 minut a přetlaku vodní páry 0,15 MPa.

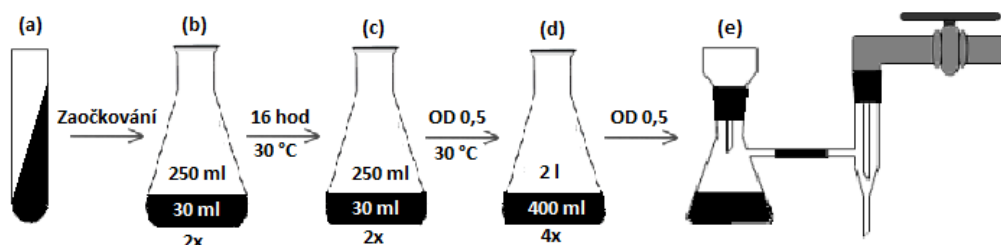
3.1.2 Kultivace *Bacillus subtilis* ATCC 21332

Příprava nočního a ranního inokula, vlastní kultivace

Biomasa *B. subtilis* narostlá na pevném médiu (1,5% přídavek agaru) byla pomocí bakteriologické kličky asepticky zaočkována do Erlenmayerovy baňky s 30 ml sterilního kultivačního média. Z této tekuté pasáže bylo odpipetováno 500 μ l do druhé baňky se stejným objemem média. Obě baňky (noční inokula, NI) byly vloženy do horkovzdušné třepačky vytemperované na konstantní teplotu 30 °C po dobu 16 hodin (přes noc). Objemy kultury byly vždy voleny tak, aby dosahovaly maximálně 2/10 objemu kultivační nádoby, aby byl zajištěn dostatečný přístup kyslíku do média a kultivace tak probíhala aerobně.

Ráno byla bakteriální kultura přeočkována ze zředěného nočního inokula do dalších dvou tekutých pasáží (ranní inokula, RI) s 30 ml kultivačního média a kultivována ve vodní třepačce vytemperované na 30 °C. V průběhu kultivace byl pečlivě sledován růst bakteriální kultury, a to spektrofotometricky měření optické hustoty bakteriální suspenze při vlnové délce 420 nm v intervalu 50 minut. Jako blank sloužila destilovaná voda. Jakmile dosáhla optická hustota požadované hodnoty $OD_{420nm} \approx 0,500$, byla takto narostlá kultura přeočkována na vlastní pokus do čtyř paralelních Erlenmayerových baněk se 400 ml vytemperovaného kultivačního média.

Vlastní pokus probíhal ve větších objemech živného média proto, aby bylo zajištěno dostatečné množství buněk a tedy větší množství fosfolipidů. S ohledem na větší objemy byly kultury inkubovány ve vytemperované horkovzdušné třepačce při 30 °C. Intervaly mezi odběry bakteriální suspenze činily 30 minut. Jakmile kultura dosáhla $OD_{420nm} \approx 0,500$, byl vlastní pokus ukončen tzv. *sklizením buněk*, tedy jejich filtrací (schéma kultivace viz **Obr. 3-1**).

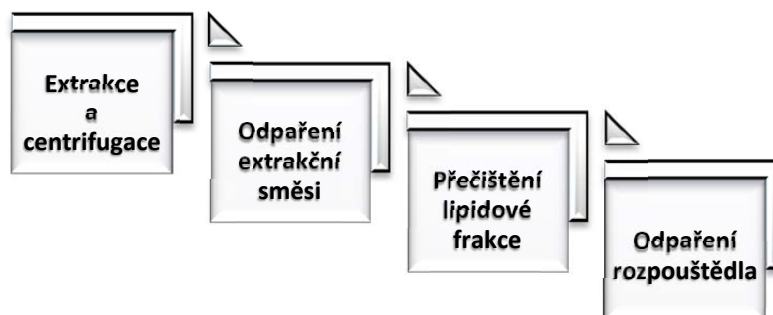


Obrázek 3-1 Schéma kultivace *Bacillus subtilis* ATCC 21332: (a) Šikmý agar s biomasou *B. subtilis*, (b) noční inokulum (NI), (c) ranní inokulum, (d) vlastní kultivace, (e) „sklizení“ bakteriální kultury, tj. filtrace za sníženého tlaku⁵

Izolace lipidové frakce

Celkový postup izolace lipidové frakce je schematicky znázorněn na **Obr. 3-2**. Bakteriální kultura byla přefiltrována na membránových filtrech za sníženého tlaku pomocí vodní vývěvy a promyta destilovanou vodou vytemperovanou na teplotu 30 °C, aby došlo k odstranění zbytků kultivačního média. Zachycená biomasa byla z filtru převedena do teflonové centrifugační zkumavky s 30 ml vychlazené extrakční směsi hexan-2-propanol (3:2, v/v) a následně resuspendována na vortexu 3x po dobu 1 minuty na jemně dispergovanou suspenzi. Následovala extrakce přes noc při teplotě 4 °C.

⁵ Při pěstování mikroorganismů je zapotřebí přenést do sterilního živného média živé buňky žádaného druhu. Tato činnost se označuje jako očkování (inokulace) a přenesené buňky se nazývají inokulum. Odtud termíny noční a ranní inokulum.



Obrázek 3-2 Postup při izolaci lipidové frakce z kultury *Bacillus subtilis* ATCC 21332

Po extrakci byla suspenze znovu promíchána na vortexu po dobu jedné minuty a následovala centrifugace, aby byl supernatant (lipidový extrakt) dostatečně oddělený od pelety (sedimentu). Supernatant byl následně převeden do srdcové baňky (100 ml) a směs hexan-2-propanol byla odpařena na vakuové rotační odparce s vodní lázní vytemperovanou na 38 °C. Protože suchý lipidový extrakt obsahoval nečistoty, byl rozpuštěn v 2x 5 ml chloroformu a přefiltrován přes fritu za použití skleněného filtru. Na filtru zůstaly zachyceny složky nelipidové povahy, které se v chloroformu nerozpustily, a filtrát byl jímán do srdcové baňky (25 ml) a opět odpařen. Po odpaření rozpouštědla zbyl na dně srdcové baňky čistý fosfolipid medového zabarvení. Kvůli uchování suchého fosfolipidového extraktu v teplotě -80 °C byl čistý extrakt převeden ze srdcové baňky do skleněné vialky (1 ml), a to jeho rozpuštěním v 2x 0,5 ml chloroformu a odpařením pod proudem dusíku.

Veškeré použité sklo, které bylo v kontaktu s fosfolipidovým extraktem, bylo před izolací řádně opláchnuto rozpouštědly (hexan-2-propanol (3:2, v/v), chloroform), aby nedošlo ke kontaminaci vzorku.

3.2 HPLC

3.2.1 Materiál, metody, přístroje

Chemikálie

Acetonitril (C_2H_3N , čistota > 99,9 %, M_r 41,05, výrobce SIGMA – Aldrich), n-hexan (C_6H_{14} , čistota 97,0 %, M_r 86,18, výrobce SIGMA – Aldrich), 2-propanol (C_3H_8O , čistota p.a., M_r 60,10, výrobce Penta), triethylamin ($C_6H_{15}N$, čistota 99,5 %, M_r 101,19, výrobce Fluka), kyselina octová (CH_3COOH , koncentrace 98,0 %, M_r 60,05, výrobce Lachema), octan amonný ($C_2H_7NO_2$, čistota p.a., M_r 77,08, výrobce LACH-NER), NH_4OH (nasycený vodný roztok, čistota p.a., M_r 35,05, výrobce LACH-NER).

Roztoky

Pro stanovení standardů fosforylovaných sloučenin byla použita mobilní fáze skládající se z acetonitrilu a 20 mM amonno-acetátového pufru o pH 4,00 a 6,50. Amonno-acetátový pufr o koncentraci 20 mM byl připraven navážením 1,54 g octanu amonného a rozpuštěním v deionizované vodě (900 ml). Titrací kyselinou octovou následovala úprava pH na 4,00. Poté následovalo doplnění deionizovanou vodou po rysku na objem 1 l v odměrné baňce. Pufr o pH 6,50 byl připraven z pufru o pH 4,00, a to titrací nasyceným roztokem NH_4OH . V průběhu experimentu se poměry acetonitrilu a amonno-acetátového pufru měnily.

Pro stanovení standardů fosfolipidů byly připraveny dvě mobilní fáze skládající se z těchto rozpouštědel: směs A. hexan-2-propanol-kyselina octová-triethylamin (82:17:1:0,08, v/v/v/v) a směs B. 2-propanol-voda-kyselina octová-triethylamin (85:14:1:0,08, v/v/v/v), příprava viz **Tab. 3-2**.

Tabulka 3-2 Přehled používaných mobilní fází pro stanovení standardů fosfolipidů

	Rozpouštědlo	Podíl (%)	Odměřený objem (ml)
Směs A	Hexan	82	246
	2-propanol	17	51
	Kyselina octová	1	3
	Triethylamin	0,08	0,239
Směs B	2-propanol	85	127
	Voda	14	21
	Kyselina octová	1	1,5
	Triethylamin	0,08	0,119

V obou případech stanovení činily koncentrace analytů 1 mg/ml. Aby nedošlo k poškození chromatografické kolony, byly mobilní fáze vždy přefiltrovány a pro samotnou analýzu uchovávány v reagenčních lahvích.

Kondicionování kolony

Před zahájením analýzy byla kolona vždy kondicionována (ekvilibrována) na používanou mobilní fázi po dobu 30 minut při konstantním průtoku 1 ml/min. Během této doby byla také žhavana deuteriová UV lampa detektoru. Po kondicionaci kolony následovaly analýzy vzorků. Mezi jednotlivými analýzami byla kolona také promývána mobilní fází, vždy po dobu 2 minut u izokratické eluce a u gradientové 40 min. Po ukončení analýz byla chromatografická kolona, určená pro stanovení fosforylovaných látek, promyta směsí acetonitril-voda (7:3, v/v), poté acetonitrem a nakonec 2-propanolem, ve kterém byla uchovávána. Chromatografická kolona, určená pro stanovení fosfolipidů, byla uchovávána ve směsi acetonitril-voda (90:10, v/v).

Přístroje a pomůcky

Analytické váhy Sartorius 486, pH metr značky JENWAY (3510 pH meter) s použitím kombinované skleněné elektrody značky JENWAY, filtrační aparatura, kapalinový chromatograf SHIMADZU DGU – 20A_{SR} s UV/VIS detektorem typu SPD-20AV, SHIMADZU s deuteriovou a wolframovou lampou, chromatografická kolona – HILIC (AZYP FRULIC-N F1001, délka 25 cm, průměr 4,6 mm, velikost částic 5 µm, náplň cyklofruktan), chromatografická kolona – Diol-HILIC (YMC-TRIART, délka 15 cm, průměr 2,0 mm, velikost částic 3 µm, náplň silikagel s navázanými diolovými skupinami), dávkovací smyčka o objemu 20 µl, PC s vyhodnocovacím programem SHIMADZU LC Postrun Analysis, dávkovací stříkačka Hamilton o objemu 250 µl, mikrofiltry (membrane nylon, průměr 25 mm, velikost pórů 0,45 µm), běžné laboratorní sklo a pomůcky.

3.2.2 Vlastní měření

Fosforylované sloučeniny

Standardní roztoky fosforylovaných sloučenin o koncentraci 1 mg/ml byly rozpuštěny v mobilní fázi tvořené z acetonitrilu a amonno-acetátového pufru. Pro vlastní měření byla používána kolona

HILIC (AZYP FRULIC-N F1001). Průtok mobilní fáze byl konstantní 1 ml/min, vzorky byly nastříkovány mechanicky mikrostříkačkou Hamilton, dávkovací smyčka měla objem 20 µl. Detekce byla prováděna souběžně při dvou vlnových délkách 205 a 254 nm. Z důvodu větší odezvy při vlnové délce 205 nm bylo od detekce při 254 nm upuštěno.

Při analýzách bylo využíváno izokratické eluce, kdy se složení mobilní fáze neměnilo. Na začátku experimentu byl používán pufr o pH 4,00 a poměr obou složek mobilní fáze acetonitril-amono-acetátový pufr byl zvolen na 85:15 (v/v). V rámci optimalizace metody byl poměr změněn na 80:20 a 70:30 (v/v). Měření byla také provedena v pufru o pH 6,50. Doba jedné analýzy trvala vždy 15 minut. Veškeré zvolené parametry byly otestovány na základě instrukcí pracovníků Katedry fyzikální a molekulární chemie, od kterých byla chromatografická kolona zapůjčena.

Fosfolipidy

Standardní roztoky fosfolipidů o koncentraci 1 mg/ml byly rozpuštěny ve směsi A: hexan-2-propanol-kyselina octová-triethylamin (82:17:1:0,08, v/v/v/v). Jako stacionární fáze sloužila kolona Diol-HILIC (YMC-TRIART). Průtok mobilní fáze byl konstantní 0,09 ml/min a jako v předchozím případě byly vzorky nastříkovány mechanicky do dávkovací smyčky o objemu 20 µl. Detekce byla prováděna při vlnové délce 190 nm.

Při stanovení fosfolipidů bylo postupováno dle odborných publikací [31,32]. Při analýzách bylo využíváno gradientové eluce, jež spočívala v použití binární směsi rozpouštědel (příprava viz 3.2.1). V průběhu analýzy byla směs B se silnějším elučním účinkem plynule přimíchávána do směsi A, čímž se vytvořil plynulý koncentrační gradient. Gradient začínal na 5 % směsi B a jeho procentuální podíl byl plynule zvyšován až na 80 % v průběhu 25 minut. Toto složení bylo udržováno 1 minutu a poté vráceno zpět na 5 % B po dobu 10 minut a poté udržováno na 5 % další 4 minuty. Celková doba byla tedy při konstantním průtoku 0,09 ml/min 40 minut.

3.3 NMR

3.3.1 Materiál, metody a přístroje

Chemikálie

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, čistota p.a., Mr 372,24, výrobce Lach-Ner), kyselina fosforečná (H_3PO_4 , 85 %, čistota p.a., Mr 98,00, výrobce Penta), deuterovaný chloroform (CD_3Cl , 99,95 %, Mr 120,38, výrobce Chemotrade Leiptzich), deuterovaný methanol (CD_3OD , 99,8 %, Mr 36,07, výrobce ARMAR Chemicals), deuterovaná voda (deuterium oxide, D_2O , 99,9 %, Mr 20,03, výrobce Sigma Aldrich).

Roztoky

Nasycený vodný roztok EDTA byl připraven rozpuštěním 0,05 g EDTA ve 100 ml deionizované vody.

Vzorky standardů fosfolipidů byly připraveny rozpuštěním 1 mg látky v 1 ml směsi rozpouštědel CD_3Cl - CD_3OD -nasycený vodný roztok EDTA (125:8:1, v/v/v).

Reálné vzorky fosfolipidů izolované z cytoplazmatické membrány *B. subtilis* byly po rozmrazení a vytemperování na laboratorní teplotu připraveny rozpuštěním v 1 ml směsi rozpouštědel CD_3Cl - CD_3OD -EDTA (125:8:1, v/v/v). Z důvodu zvýšení počtu jader fosforu excitovaných během jedné analýzy byly jednotlivé paralely reálných vzorků fosfolipidů spojeny a proměřovány společně.

Přístroje a pomůcky

Analytické váhy Sartorius 486, skleněné kyvety (5 mm), ultrazvuková lázeň značky ELMA, NMR spektrometr 400 MHz značky Varian INOVA vybavený čtyřjadernou sondou ASW, NMR spektrometr 600 MHz značky Bruker AVANCE III vybavený širokopásmovou sondou BBO, vyhodnocovací program TopSpin 2.1, běžné laboratorní sklo a pomůcky.

3.3.2 Vlastní měření

V první fázi experimentu byly standardy fosfolipidů (1 mg) rozpuštěny v 1 ml směsi rozpouštědel: $\text{CD}_3\text{Cl}-\text{CD}_3\text{OD}-\text{EDTA}$ (125:8:1, v/v/v) a pomocí skleněného kapátka převedeny do měřicí kyvety (5 mm). Měření bylo provedeno na NMR spektrometru 400 MHz při teplotě 25 °C s délkou excitačního pulzu 20 μs , relaxační prodlevou 5 s, počtem opakování 5 000 (celkový čas měření 5 hodin na vzorek).

Po proměření standardů fosfolipidů byl analyzován reálný vzorek fosfolipidové frakce izolované z *B. subtilis*. Z důvodu zvýšení počtu jader fosforu v NMR vzorku byly spojeny a proměřovány nejprve 3 paralely, později 6 paralel reálných vzorků fosfolipidů společně. Pro dosažení vyšší citlivosti byla ^{31}P měření provedena na NMR spektrometru 600 MHz s těmito experimentálními parametry: délka excitačního pulzu 13 μs , relaxační prodleva 5 s, počet opakování 15 000, celkový čas měření 21 hodin, teplota 25 °C.

V obou případech byla jako referenční látka pro kalibraci chemického posunu použita 85% H_3PO_4 měřená v nezávislém experimentu.

3.4 CZE

3.4.1 Materiál, metody a přístroje

Chemikálie

Hydroxid lithný ($\text{LiOH}\cdot n\text{H}_2\text{O}$, čistota p.a., Mr 23,95, výrobce Lachema), CHES ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$, čistota p.a., Mr 207,29, výrobce Merck), $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (čistota p.a., Mr 358,14, výrobce Lachema), 2-propanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, čistota p.a., Mr 60,10, výrobce Penta), aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, čistota > 99,98 %, Mr 58,08, výrobce LACH-NER), acetonitril ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, čistota > 99,9 %, Mr 41,05, výrobce SIGMA – Aldrich), methanol (CH_4O , čistota > 99,9 %, Mr 32,04, výrobce SIGMA – Aldrich), octan amonný ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$, čistota p.a., Mr 77,08, výrobce LACH-NER), kyselina octová (CH_3COOH , koncentrace 99,7 %, Mr 60,05, výrobce SIGMA – Aldrich), thiomočovina ($\text{C}_1\text{H}_4\text{N}_2\text{S}_1$, připravený vodný roztok o koncentraci 1 mg/ml).

Roztoky

Separční elektrolyt Li-CHES (60/100 mM) byl připraven navážením 0,6300 g $\text{LiOH}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ a 5,1820 g CHES a rozpuštěním ve 250 ml destilované vody. Takto připravený pufr měl pH 9,90 a byl používán pro vlastní separaci a promývání kapiláry mezi analýzami. Pro přípravu vzorků byl použit 10x zředěný pufr.

Zásobní roztoky standardů fosforylovaných sloučenin byly připraveny do skleněných vialek rozpuštěním 1 mg v 1 ml 10x zředěného separačního pufru (1 mg/ml). Při vlastní analýze bylo do vialky odpipetováno 300 μl nebo 600 μl zásobního roztoku vzorku a 2,7 ml resp. 2,4 ml 10x zředěného pufru (0,1 mg/ml a 0,2 mg/ml).

Přídavek organických rozpouštědel činil v případě 5 % objemu 150 μ l, v případě 10 % činil 300 μ l, u 15 % činil 450 μ l, u 20 % objemu činil 600 μ l. Každý vzorek s jiným poměrem organické složky byl připraven do nové vialky se 3 ml separačního pufru.

Pro nevodnou elektroforézu byl separační elektrolyt acetonitril-2-propanol (3:2, v/v), 0,3 % CH_3COOH a 60 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, připraven smísením 60 ml acetonitrilu, 40 ml 2-propanolu, 0,3 ml kyseliny octové a 0,4620 g octanu amonného. pH separačního elektrolytu bylo 8,20.

Navážky standardů fosfolipidů 1 mg byly ve skleněných vialkách rozpuštěny v 1 ml separačního elektrolytu (1 mg/ml). Směsné vzorky byly připraveny odpipetováním objemů těchto vzorků v různých poměrech.

Promývání kapiláry

Při používání separačního pufru Li-CHES (60/100 mM) byla kapilára na začátku všech měření po vložení napětí na platinové elektrody promývána NaOH (1 M), aby se stabilizoval EOF. Poté následovalo promytí deionizovanou vodou a nakonec promytí používaným separačním pufrem. Každý krok trval přibližně 5 minut. Po promytí kapiláry a ustálení EOF následovalo vlastní nadávkování úzké zóny analytu ($3,4 \cdot 10^{-6}$ ml při tlaku 980 Pa ve vodném prostředí, $2,6 \cdot 10^{-6}$ ml při tlaku 771 Pa v nevodném prostředí) po dobu 12 s. Vialka se vzorkem byla po hydrodynamickém nadávkování vyměněna zpět za vstupní vialku se separačním pufrem (inletem). S výstupní vialkou (outlet) nebylo nijak manipulováno, neboť obsahovala separační pufr. Vložením napětí na elektrody 20 kV následovalo vlastní měření vzorku. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára vždy promývána separačním pufrem po dobu 3 minut.

Analýzy v nevodném prostředí probíhaly v nové křemenné kapiláře. Před začátkem každého měření byla kapilára proplachována 1 M NaOH po dobu 20 minut, následovalo promývání deionizovanou vodou a poté methanolem, vždy po dobu 10 minut. V konečné fázi byla kapilára promývána minimálně 20 minut separačním elektrolytem, dokud nedošlo k ustálení EOF. Poté následovalo vlastní nadávkování vzorku, které bylo shodné s předešlým postupem. Napětí vkládané na elektrody činilo 30 kV a promývání kapiláry mezi jednotlivými měřeními separačním elektrolytem trvalo vždy 3 minuty.

Hydrodynamické dávkování (výška 10 cm) bylo vybráno záměrně, aby měl nadávkovaný vzorek v kapiláře vždy stejné složení jako vzorek ve vialce a nedocházelo tak ke zvýhodnění kationtů oproti aniontům.

Přístroje a pomůcky

Skleněné vialky, ultrazvuková lázeň značky ELMA, pH metr značky JENWAY (3510 pH meter) s použitím kombinované skleněné elektrody značky JENWAY, běžné laboratorní sklo a pomůcky, pro CZE ve vodném prostředí křemenná kapilára (firma Polymicro Technology, typ TWC-S75 (USA), vnější povrch pokrytý polyimidem, parametry: d_i 75 μ m, OD 375 μ m, L_D 40 cm, L_C 50 cm), pro NACE křemenná kapilára (firma Polymicro Technology, typ TWC-S75 (USA), vnější povrch pokrytý polyimidem, parametry: d_i 75 μ m, OD 375 μ m, L_D 50 cm, L_C 70 cm), zdroj vysokého napětí značky Hochspannungs-Netzgerät, HCN 35-35000 (napětí vkládáno na platinové elektrody), přístroj kapilární elektroforézy a bezkontaktní vodivostní detektor (CCD, hliníkové elektrody), obojí zkonstruováno na Katedře analytické chemie Univerzity Karlovy v Praze, UV/VIS detektor Spectra-physics 100, vyhodnocovací program Clarity version 2.2.0.73, komerční přístroj kapilární zónové elektroforézy značky Agilent 3D^{CE} Technologies, vyhodnocovací program ChemStation software, počítačový software PeakMaster 5.1.

3.4.2 Vlastní měření

Analýza vzorků standardů fosforylovaných sloučenin

K výběru vhodného pufru byl použit počítačový software PeakMaster 5.1, který slouží k vyhledávání optimálních podmínek pro separaci, neboť tento program umožňuje předpovědět důležité parametry separačního systému a simuluje výsledek separace. Na základě této simulace byl zvolen pufr Li-CHES (60/100 mM) o pH 9,90.

Standardy fosforylovaných sloučenin (1 mg/ml) byly analyzovány nejprve individuálně v 10x zředěném separačním elektrolytu za použití fotometrického detektoru při vlnové délce 205 nm a později za použití bezkontaktního vodivostního detektoru (contactless conductivity detector, CCD). Při průchodu zóny analytu místem detekce byla zaznamenána změna vodivosti a vyhodnocovací program tuto změnu v elektroferogramu zaznamenal jako pík. Při identifikaci analytů byla využívána metoda standardního přídávku. V tomto případě byla koncentrace analytu zdvojnásobena. Po proměření jednotlivých analytů následovala analýza směsi těchto látek za stejných experimentálních podmínek.

V další fázi experimentu následovala měření s přídávkem organického rozpouštědla: acetonu, acetonitrilu, 2-propanolu a methanolu tak, aby jejich přídavek činil 5 %, 10 %, 15 % a 20 % z celkového objemu pufru. V rámci optimalizace metody byly také postupně měněny parametry analýzy. Nejprve bylo sníženo separačním napětí na 15 kV. Poté byla zvýšena a snížena doba dávkování z 12 s na 6 s a na 24 s.

Analýza směsi byla nejprve provedena na přístroji kapilární elektroforézy zhotovené na Katedře analytické chemie a poté pro porovnání na komerčním přístroji kapilární elektroforézy Agilent na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie, jehož součástí byl DAD detektor.

V průběhu analýzy bylo také zapotřebí identifikovat EOF. K tomuto účelu byl použit jako značkovač (marker) EOF vodný roztok thiomochoviny (1 mg/ml) jako neutrální látky, která nevykazuje vlastní elektroforetickou migraci uvnitř separačního elektrolytu, a je tedy unášena pouze elektroosmotickým tokem.

Analýza vzorků standardů fosfolipidů

Při stanovení fosfolipidů metodou NACE bylo postupováno dle odborné publikace [38]. Příprava separačního elektrolytu je uvedena v 3.4.1.

Vzhledem k amfipatickému charakteru fosfolipidů byly analýzy prováděny v nevodném prostředí za použití nové křemenné kapiláry. Nejprve byl každý fosfolipid analyzován separátně, poté následovala analýza směsi. Všechna tato měření probíhala za konstantních podmínek, tj. napětí 30 kV a době dávkování 12 s. Fosfolipidy byly detekovány pomocí fotometrického detektoru v UV oblasti při vlnové délce 200 nm. Při průchodu zóny analytu detekčním okénkem vzrostla absorbance a vyhodnocovací program tuto změnu v elektroferogramu zaznamenal jako kladný pík. V rámci optimalizace metody byly postupně měněny jednotlivé parametry: velikost vkládaného napětí (30 kV, 20 kV), koncentrace analytů (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml) a prodloužení či zkrácení doby dávkování (z 12 s na 6 s a na 24 s).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

První část experimentální práce byla soustředěna na přípravu reálných vzorků fosfolipidů, které měly být posléze podrobeny kvalitativní a kvantitativní analýze na optimalizované analytické metodě. K tomuto účelu sloužily fosfolipidy izolované z cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Samotné izolaci fosfolipidové frakce předcházela kultivace tohoto kmene za optimálních podmínek, tj. dostatečného vzdušnění, teploty 30 °C a neutrálního pH živného média.

Druhá část práce spočívala ve snaze o stanovení komerčních standardů fosfolipidů a fosforylovaných látek vybranými a účinnými analytickými metodami: HPLC, NMR a CZE. Po optimalizaci metody na standardech měla následovat kvantitativní analýza a následně identifikace a kvantifikace reálných vzorků, jenž měly být porovnány s výsledky získanými metodou TLC, jež se v současnosti stále pro tyto účely využívá.

4.1 Příprava reálných vzorků fosfolipidů

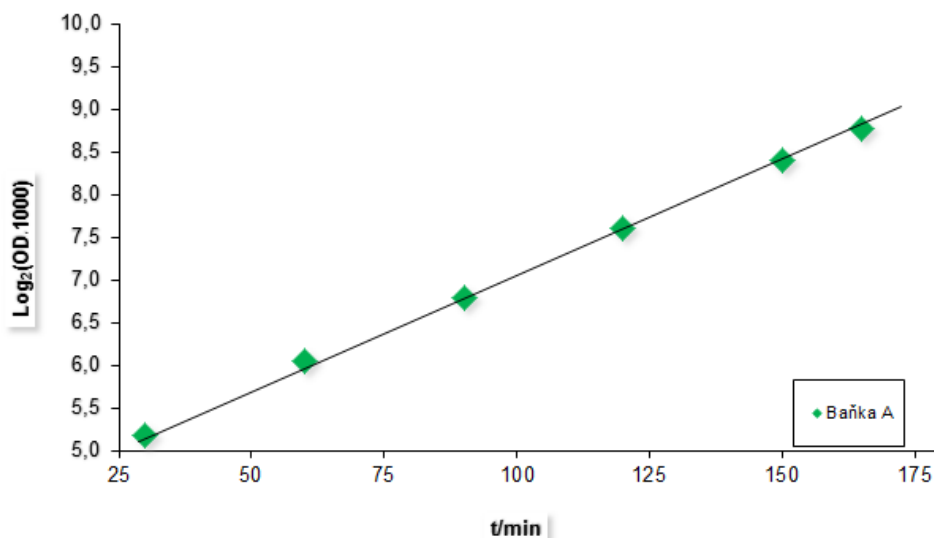
Kultivace bakteriální kultury *B. subtilis* a izolace lipidových frakcí probíhaly dle postupů uvedených v 3.1.2. V **Tab. 4-1** a v **Obr. 4-1** je uveden příklad jedné z mnoha provedených kultur, které vždy probíhaly za stejných podmínek, aby bylo zajištěno stejné složení cytoplazmatické membrány a zastoupení jednotlivých fosfolipidových tříd. Obsah reálného vzorku fosfolipidu získaného izolací a přečištěním, činil při objemu 400 ml kultivačního média přibližně 1 mg.

Tabulka 4-1 Naměřené hodnoty optické density bakteriální kultury na spektrofotometru Helios γ při vlnové délce 420 nm a výpočty rychlostní růstové konstanty ($c/\text{gen}\cdot\text{min}^{-1}$) a doby zdvojení (T/min)⁶

t/min	OD _{čistá}	log ₂ (OD·1000)	c (gen/min)	T /min
0	0,114	6,833	0,027	38
30	0,036	5,170		
60	0,066	6,044		
90	0,111	6,794		
120	0,195	7,607		
150	0,339	8,405		
165	0,435	8,765		
170	0,453	8,823		

⁶ Naměřené a vypočítané hodnoty uvedené v tabulce byly vynášeny do grafu $\log_2(\text{OD}\cdot 1000)$ v závislosti na čase t/min. Doba zdvojení bakterií (T/min) byla stanovena pomocí funkce lineární regrese. V exponenciální fázi růstu bakterií je závislost hodnoty logaritmu optické density na čase lineární. Směrnice přímky proložené experimentálními body v lineární oblasti růstové křivky udává rychlostní růstovou konstantu ($c/\text{gen}\cdot\text{min}^{-1}$), tj. počet generací za časovou jednotku, a její převrácená hodnota ($1/c$) dobu zdvojení (T/min), což je doba, při níž se počet buněk zdvojnásobí.

Vlastní kultivace *B. subtilis* ATCC 21332



Obrázek 4-1 Růstová křivka *B. subtilis* – vlastní kultivace: T 30 °C, rychlost třepání 120 rpm, pH média 7,0

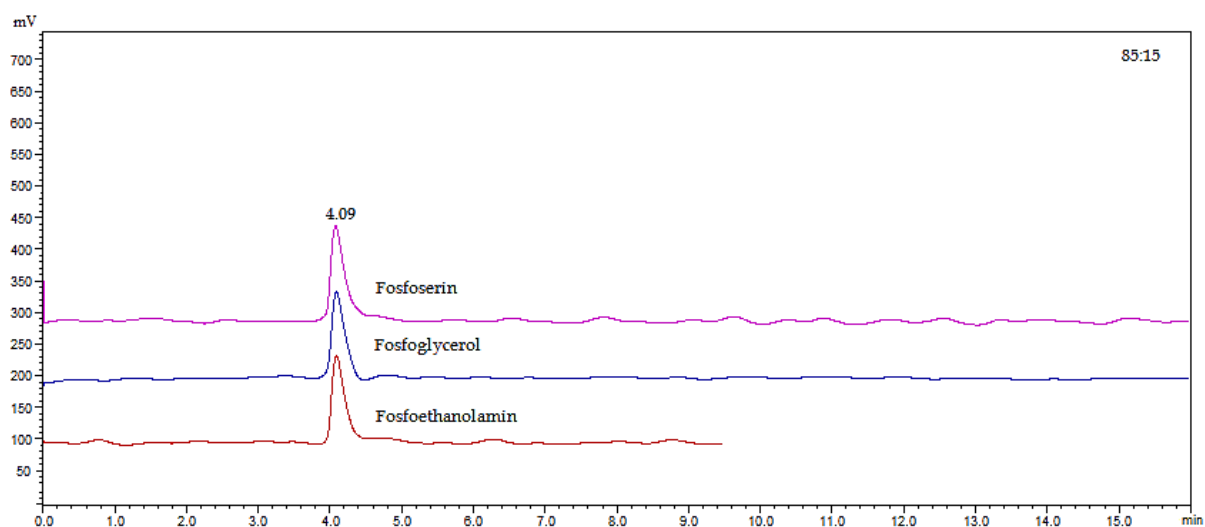
Na počátku bylo zkusmo provedeno několik kultivací *B. subtilis*, aby došlo k osvojení celého postupu, neboť dílčí kroky na sebe musí plynule navazovat, aby nedocházelo k časovým prodlevám, které by ovlivnily růst bakterií. Kultivace probíhaly vždy za stejných podmínek. Úskalí spočívala zejména v rychlosti odběrů kultury při sledování optické denzity, včasný odhad přeočkování (inokulace) bakteriální kultury a také v rychlosti filtrace buněk, neboť v případě kultivací více paralel najednou mohlo snadno dojít k překonání limitu růstu, čímž by došlo ke změně fosfolipidového složení. S rostoucím počtem kultivací byla tato úskalí úspěšně překonána.

4.2 HPLC

Metou HPLC byly nejprve analyzovány standardy fosforylovaných sloučenin (1 mg/ml) na chromatografické koloně s HILIC stacionární fází a experimentální parametry včetně používané mobilní fáze byly testovány na základě instrukcí pracovníku Katedry fyzikální a makromolekulární chemie, od kterých byla kolona zapůjčena.

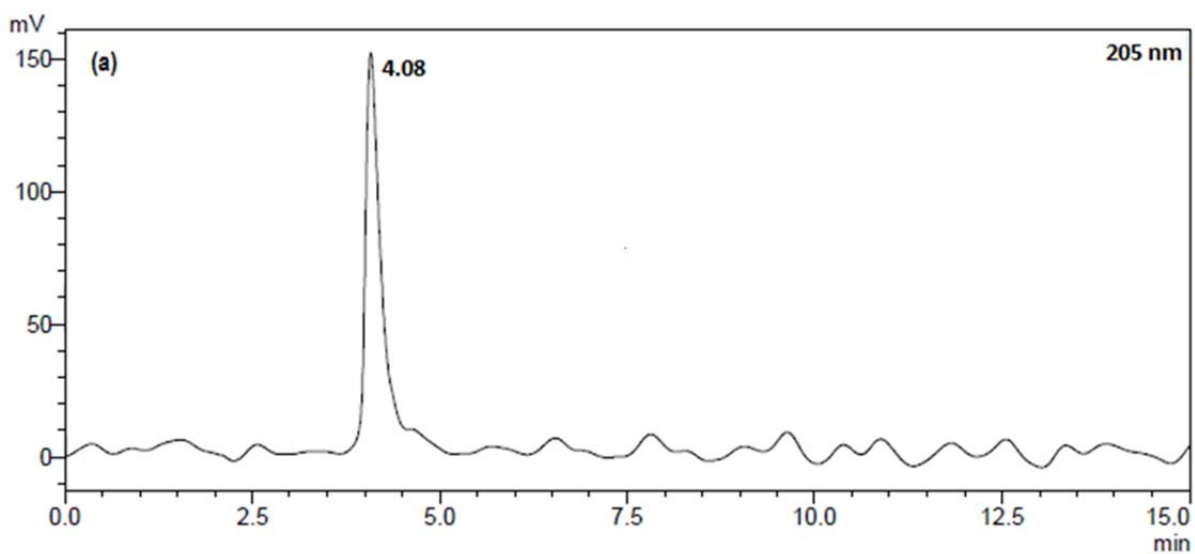
Protože analyzované látky tvořily bezbarvé roztoky, které neabsorbují ve viditelné oblasti spektra, byly detekovány v UV oblasti nejprve při dvou vlnových délkách 205 a 254 nm. Z důvodu větší odezvy při 205 nm bylo od detekce při druhé vlnové délce upuštěno.

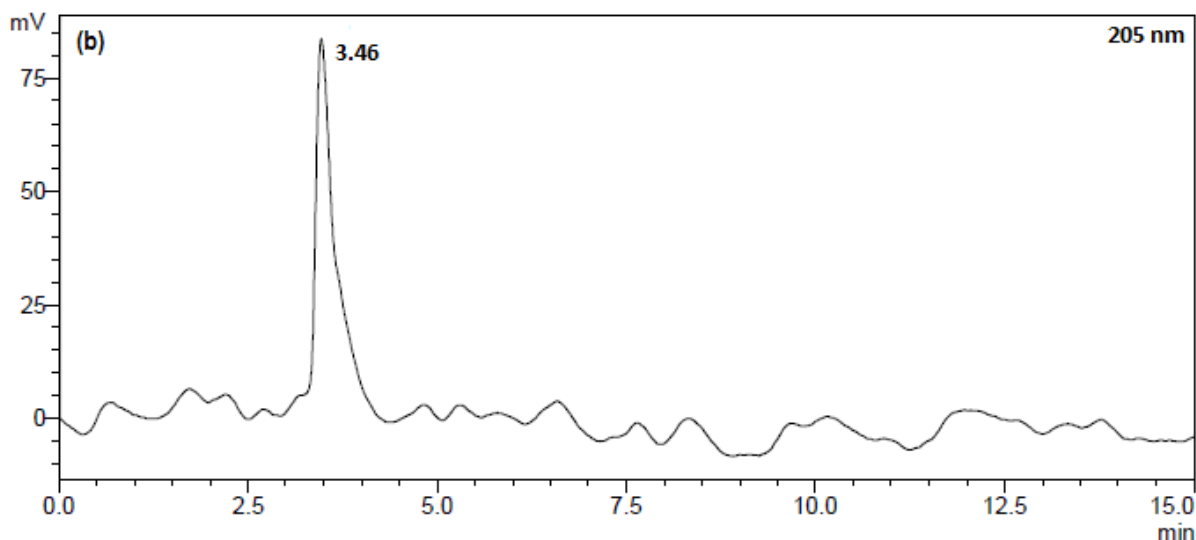
Přes velký šum základní linie se podařilo získat reprezentativní záznam. Bohužel však retenční časy všech samostatně měřených látek vycházely téměř shodně. Je tedy evidentní, že za daných experimentálních podmínek nedocházelo k separaci a studované látky eluovaly v mrtvém čase (Obr. 4-2).



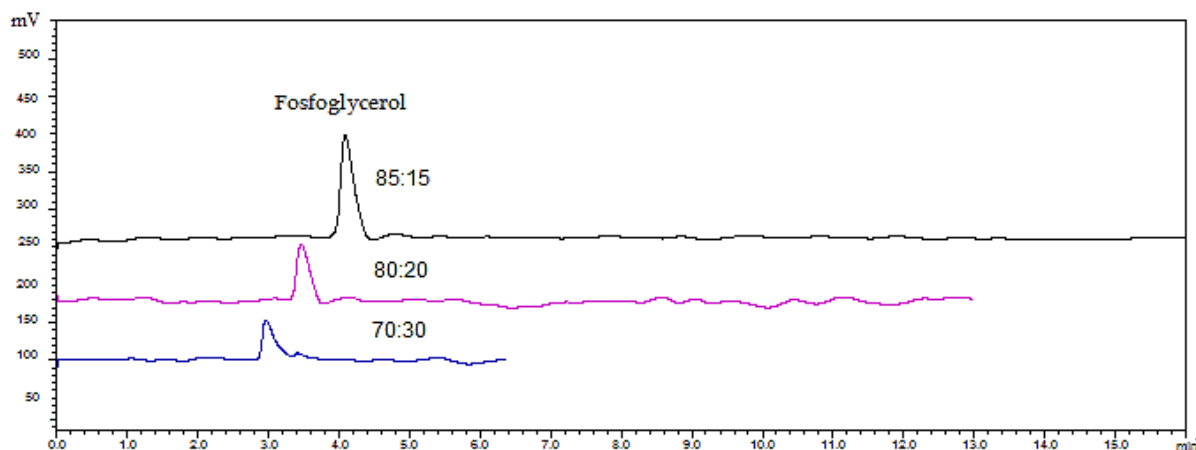
Obrázek 4-2 Chromatogram fosforylovaných sloučenin: fosfoserinu, fosfoglycerolu a fosfoethanolaminu na koloně HILIC: koncentrace 0,1 mg/ml, mobilní fáze acetonitril-amonno-acetátový pufr (85:15, v/v), pH 4,00, průtok 1 ml/min, λ 205 nm.

Z tohoto důvodu byly změněny poměry složek mobilní fáze o pH 4,00 na 80:20 a 70:30 (v/v). S klesajícím podílem acetonitrilu v mobilní fázi docházelo ke zkrácení retenčních časů. U poměru 85:15 byl retenční čas 4,08 min, u poměru 80:20 byl 3,46 min, u poměru 70:30 byl 2,96 min. S klesajícím podílem acetonitrilu také docházelo ke zvyšování šumu základní linie. Separace analytů se i přesto nezdařila, jak dokazují **Obr. 4-3 a 4-4**.



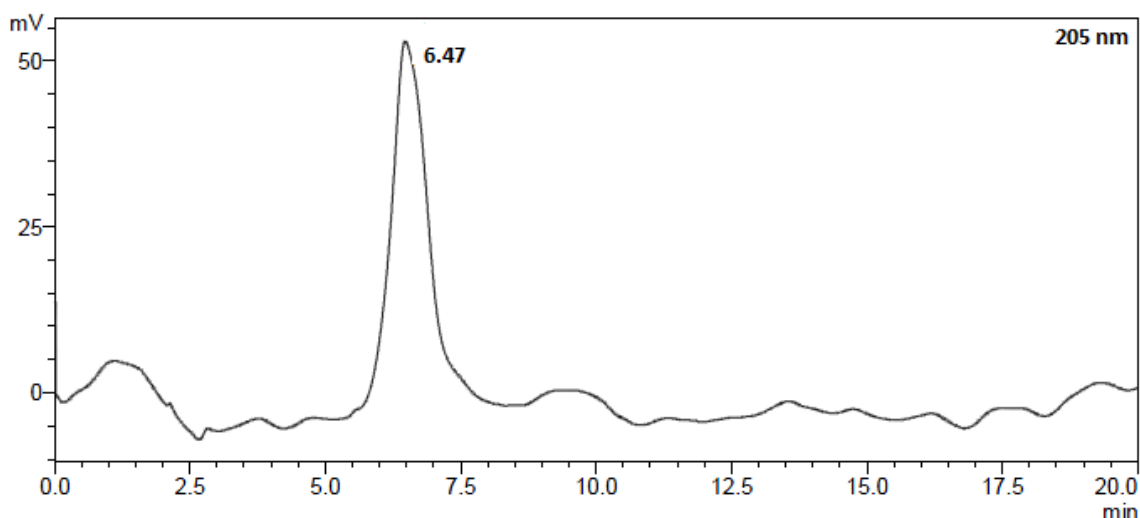


Obrázek 4-3 Chromatogram fosfoserinu v mobilní fázi acetonitril-amonno acetátový pufr v poměru (a) 85:15 (v/v), (b) 80:20 (v/v): koncentrace 0,1 mg/ml, pH 4,00, průtok 1 ml/min, λ 205 nm.



Obrázek 4-4 Chromatogram fosfoglycerolu v mobilní fázi acetonitril-amonno-acetátový pufr v poměrech 80:15, 82:20 70:30 (v/v): koncentrace 0,1 mg/ml, pH 4,00, průtok 1 ml/min, λ 205 nm.

Protože se při změně složení mobilní fáze nepodařilo analyty separovat, byla následující měření provedena v mobilní fázi o pH 6,50. Zvýšením pH byly prodlouženy retenční časy a také došlo k rozšíření píků, ale analyty opět nebyly zadržovány stacionární fází a vycházely s mrtvým objemem v čase 6,47 min při použití mobilní fáze acetonitril-amonno-acetátový pufr (85:15, v/v), viz **Obr. 4-5**.



Obrázek 4-5 Chromatogram fosfofoserinu: koncentrace 0,1 mg/ml, mobilní fáze acetonitril-amonno-acetátový pufr (85:15, v/v), pH 6,50, průtok 1 ml/min, λ 205 nm.

Při stanovení fosfolipidů (1 mg/ml) byla využívána kolona Diol-HILIC s polární stacionární fází. Nastavené parametry včetně binární mobilní fáze byly ověřovány dle publikací [31,32]. Stejně jako v předchozím případě i zde byla využita UV detekce při vlnové délce 190 nm, neboť také standardy fosfolipidů poskytují bezbarvé roztoky. Navzdory dodržování instrukcí výrobce při kondicionaci kolony se nepodařilo ustálit šum základní linie v průběhu 40 minut a ani získat reprezentativní záznamy.

Zdá se, že se v tomto případě problém úspěšného stanovení spíše skrývá ve vhodné detekční metodě. V odborné literatuře se ve většině případů používá úspěšně HPLC-MS. Z důvodu nedostupnosti HPLC-MS byla měření prováděna pomocí DAD detektoru při vlnové délce 205 nm.

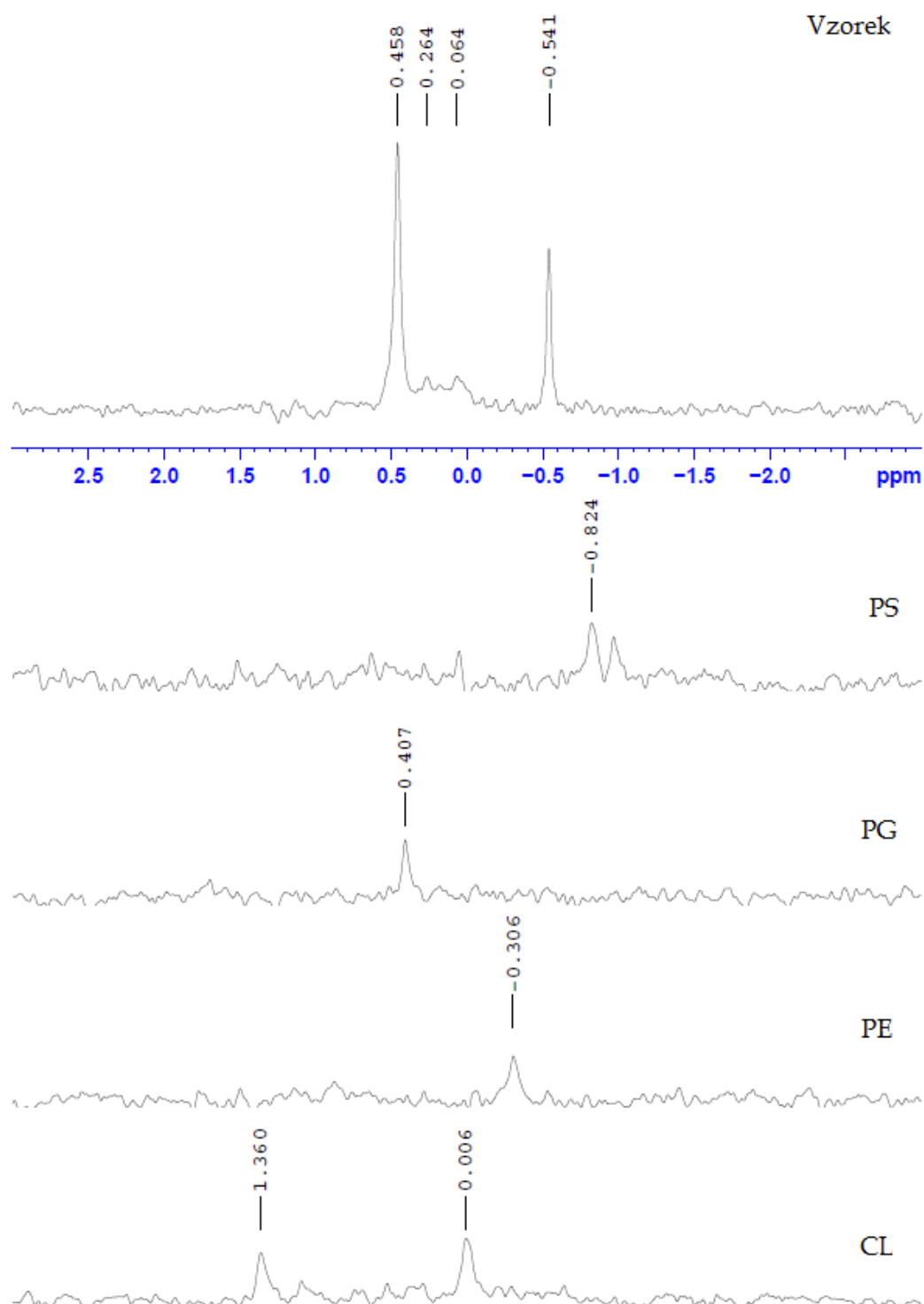
4.3 NMR

V první fázi experimentu byla proměřena ^{31}P NMR spektra standardů fosfolipidů (1 mg/ml) ve směsi rozpouštědel CD_3Cl - CD_3OD -EDTA (125:8:1, v/v/v) na 400 MHz spektrometru při teplotě 25 °C proti referenční látce 85% H_3PO_4 . Každé měření trvalo 5 hodin. Spektra (chemické posuny) se podařilo i přes nízký poměr signál-šum spolehlivě určit pro fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylglycerol a kardiolipin. Pro dosažení větších signálů a zkrácení doby analýzy je třeba analyzovat větší koncentraci analytů. Další možnost také spočívá v nahrazení 400 MHz spektrometru za 600 MHz spektrometr.

Po proměření standardních látek byl analyzován reálný vzorek fosfolipidů izolovaný z cytoplazmatické membrány *B. subtilis* dle postupů v 3.3.2. Měření probíhala na 600 MHz NMR spektrometru po dobu 21 hodin při téže teplotě, proti referenční látce 85% H_3PO_4 . Aby bylo zajištěno dostatečné množství potřebných jader fosforu (dostatečná koncentrace), byly na začátku měření spojeny 3 paralelní vzorky lipidové frakce izolované z *B. subtilis*. I přesto se však reprezentativní spektrum nepodařilo získat. Proto byla analýza provedena znovu s dvojnásobným množstvím jader fosforu – bylo tedy spojeno 6 paralelních vzorků lipidových frakcí dohromady a proměřeno za stejných podmínek. Získané spektrum bylo následně porovnáno se spektry standardů (**Obr. 4-6**).

Porovnáním chemických posunů reálného vzorku s posuny standardů fosfolipidů bylo zjištěno, že se od sebe zásadně liší. Chemické posuny standardů tedy nelze jednoznačně přiřadit jednotlivým

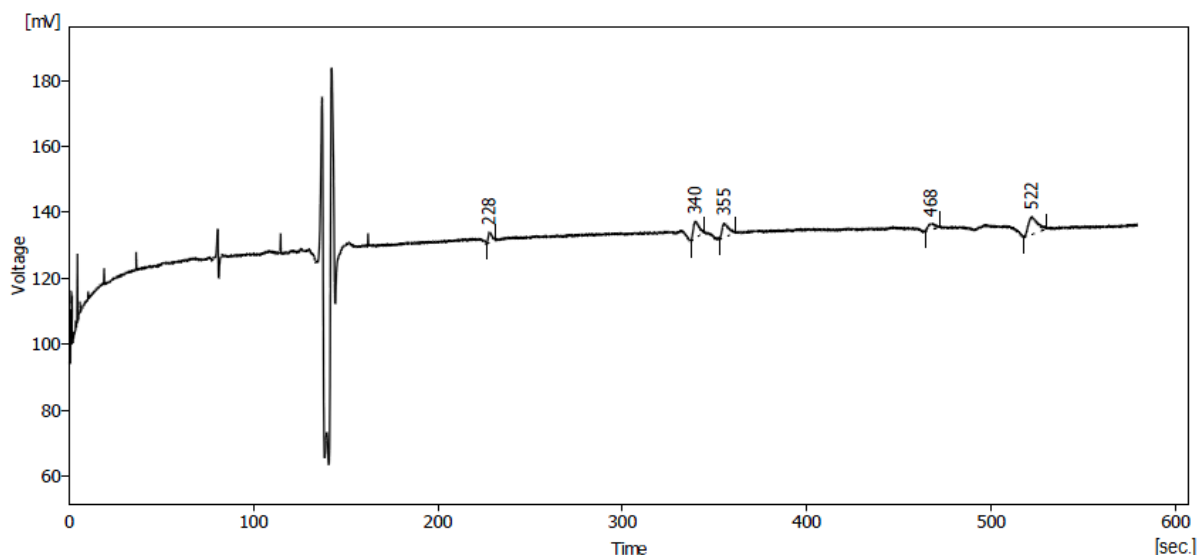
signálům u reálného vzorku. Možnou příčinou může být rozdílné zastoupení mastných kyselin v každé molekule fosfolipidu. Nicméně i v tomto případě by se chemické posuny lišily jen nepatrně. Přes podrobné zkoumání problematiky však doposud nebyla nalezena příčina.



Obrázek 4-6 Srovnání ^{31}P NMR spekter standardů fosfolipidů: kardiolipinu (CL), fosfatidylethanolaminu (PE), fosfatidylglycerolu (PG) a fosfatidylserinu (PS) se spektrem reálného vzorku fosfolipidů izolovaného z cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Vzorky standardů fosfolipidů (1 mg/ml) byly měřeny na 400 MHz spektrometru vždy po dobu 5 hodin při teplotě 25 °C. Spektrum reálného vzorku bylo proměřeno po spojení 6 paralel izolovaných vzorků z důvodu zvýšení koncentrace fosforu. Měření bylo provedeno v 5 mm skleněné kyvetě na 600 MHz spektrometru po dobu 21 hodin při téže teplotě.

4.4 CZE

Analýza standardů fosforylovaných sloučenin probíhala dle postupů uvedených v 3.4.2. Nejprve byly analyzovány standardy fosforylovaných sloučenin (1 mg/ml) v 10x zředěném separačním elektrolytu Li-CHES (60/100 mM) individuálně za použití fotometrického detektoru při vlnové délce 205 nm. Protože na záznamech nebyly patrné žádné signály, byl fotometrický detektor nahrazen bezkontaktním vodivostním detektorem (CCD). Použitím tohoto detektoru byly na záznamech odezvy patrné, ale při koncentraci 1 mg/ml velmi nízké. Při identifikaci analytů byla využívána metoda standardního přídávku z důvodu vyloučení systémových píků. V tomto případě byla koncentrace analytu zdvojnásobena. Po proměření jednotlivých analytů následovala analýza směsi těchto látek (**Obr. 4-7**). Zředěný separační elektrolyt byl používán z důvodu zakoncentrování analytu (sample stacking) po vložení separačního napětí na elektrody, neboť vykazoval nižší elektrickou vodivost než nezředěný separační elektrolyt. Elektroosmotický tok byl identifikován přídatkem thiomocoviny.



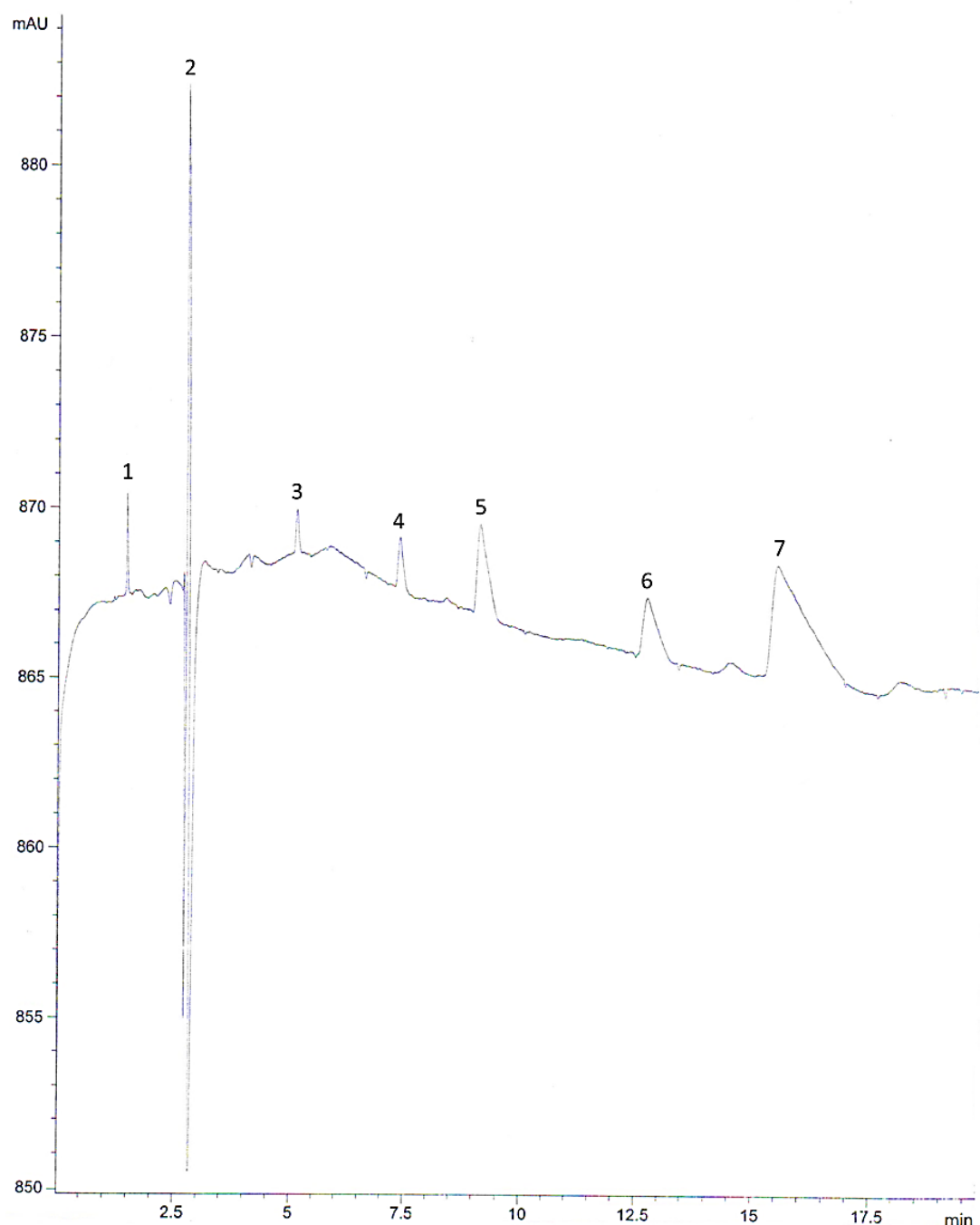
Obrázek 4-7 Elektroferogram směsi standardů fosforylovaných sloučenin (1 mg/ml) v separačním elektrolytu Li-CHES (60/100 mM) o pH 9,90: separační napětí 20 kV, doba dávkování 12 s, detekce CCD. Analyty byly separovány v tomto pořadí podle migračních časů: fosfoethanolamin (228 s), fosfoserin (340 s), fosfoglycerol (355 s), $H_2PO_4^-$ (468 s) a HPO_4^{2-} (522 s).

Po proměření směsi analytů a identifikaci v elektroferogramu byla měření provedena s přídatkem organického rozpouštědla: acetonu, acetonitrilu, 2-propanolu a methanolu. Přídatkem činil nejprve 5 % objemu, poté byl zvýšen na 10, 15 a 20 % objemu. Přídatkem organické složky mělo dojít k zúžení píků a zvýšení separační účinnosti. Výsledkem přídávku organické složky bylo prodloužení migračních časů a naopak rozmývání zón analytů. Při 15 a 20% přídávku trvala analýza jedné směsi více než 60 minut a zóny (píky) byly natolik rozmyté, že bylo od těchto přídávků upuštěno a zbylé analýzy byly dokončeny pouze při 5 a 10 % přídávku. Bohužel i v tomto případě nebyla nalezena žádná pozitiva – prodloužily se migrační časy, tvary a velikosti píků se nezlepšily.

V rámci optimalizace metody byla také provedena měření při nižším separačním napětí 15 kV, a nakonec byla zvýšena a snížena doba dávkování z 12 s na 6 s a na 24 s. Snížením napětí docházelo opět k prodloužení migračních časů a změna doby dávkování neměla na takto nízkou odezvu vliv.

Protože používaný vodivostní detektor kapilární elektroforézy poskytoval nízkou odezvu i přes velké koncentrace analytů a dlouhou dobu dávkování (12 s), byla analýza směsi standardů

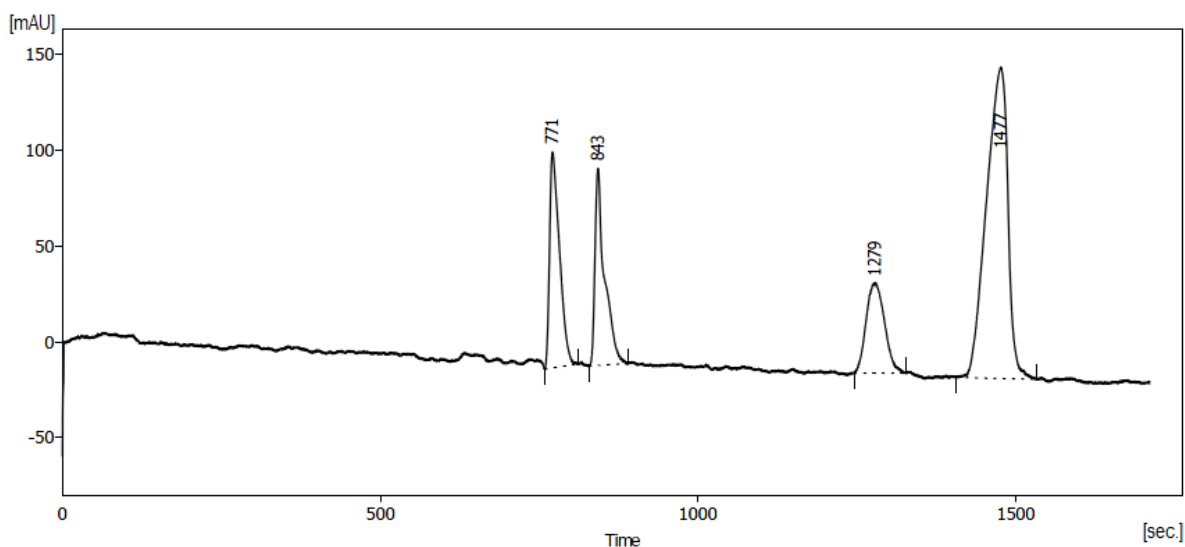
fosforylovaných sloučenin pro porovnání provedena na komerčním přístroji kapilární elektroforézy na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie, jehož součástí byl DAD detektor. Separace byla provedena při separačním napětí 20 kV, koncentraci analytů 1 mg/ml, době dávkování 3 s při tlaku 30 mbar, za použití DAD detektoru při vlnové délce 205 nm. Ze získaného elektroferogramu (**Obr. 4-8**) je patrné, že lze úspěšně provést separaci fosforylovaných sloučenin v separačním elektrolytu Li-CHES (60/100 mM) o pH 9,90. Identifikace nebyla prozatím provedena. Protože však separace probíhala za stejných podmínek jako u zkonstruovaného detektoru, na kterém se podařilo jednotlivé analyty identifikovat, lze předpokládat stejné retenční pořadí.



Obrázek 4-8 Elektroferogram směsi standardů fosforylovaných sloučenin (1 mg/ml) v separačním elektrolytu Li-CHES (60/100 mM) o pH 9,90 na komerčním přístroji kapilární elektroforézy: separační napětí 20 kV, doba dávkování 3 s při tlaku 30 mbar, λ 205 nm. Analyty byly separovány v tomto pořadí podle migračních časů: **1** – Na^+ , **2** – EOF, **3** - fosfoethanolamin, **4** - fosfoserin, **5** - fosfoglycerol, **6** - H_2PO_4^- , **7** - HPO_4^{2-} .

Analýza standardů fosfolipidů (PE, PG, CL) probíhala v nevodném prostředí separačního elektrolytu acetonitril-2-propanol (3:2, v/v), 0,3 % CH_3COOH a 60 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v nové křemenné kapiláře na zkonstruovaném přístroji CZE. Nejprve byl každý fosfolipid analyzován zvlášť a stejně jako v předchozím případě i zde byla k identifikaci využívána metoda standardního přídávku. Protože bylo postupováno dle odborné publikace [38], byly fosfolipidy analyzovány při separačním napětí 30 kV při vlnové délce 200 nm. Doba dávkování dosahovala 12 s.

Po úspěšné analýze jednotlivých standardů fosfolipidů byly analyzovány směsi těchto látek. I zde bylo dosaženo kladných výsledků, jak je patrné z **Obr. 4-9**. V rámci optimalizace metody byla jednotlivá měření prováděna při separačním napětí 20 a 15 kV a nakonec byla zvýšena a snížena doba dávkování z 12 s na 6 a 24 s. Stejně jako u fosforylovaných látek snížením napětí docházelo k prodloužení migračních časů.



Obrázek 4-9 Elektroferogram směsi standardů fosfolipidů (1 mg/ml) v separačním elektrolytu acetonitril-2-propanol (3:2, v/v), 0,3 % CH_3COOH a 60 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ o pH 8,20: separační napětí 30 kV, doba dávkování 12 s, λ 200 nm. Analyty byly separovány v tomto pořadí podle migračních časů: fosfatidylethanolamin (PE, 843 s), fosfatidylglycerol (PG, 1279 s) a kardiolipin (CL, 1477 s). První pík v elektroferogramu odpovídá EOF (771 s).

5 ZÁVĚR

První část diplomové práce byla zaměřena na kultivaci bakterie *Bacillus subtilis* ATCC 21332, za účelem produkce a následné izolace lipidové frakce, která později sloužila jako reálný vzorek pro optimalizovanou analytickou metodu. Tato bakterie byla zvolena, protože se jedná o nejvíce prostudovaný druh gram-pozitivních bakterií, který je v laboratořích běžně využíván a studován - je nepatogenní a tvoří odolné endospory. Pro zajištění dostatečného množství reálných vzorků bylo provedeno mnoho kultivací za stejných podmínek. Výtěžek z jedné paralely činil přibližně 1 mg.

Ve druhé části projektu byla pozornost věnována analytickým metodám HPLC, CZE a NMR, konkrétně pak určení vhodných experimentálních podmínek pomocí vybraných standardů fosfolipidů fosfatidylethanolaminu, fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolu, krdiolipinu, a fosforylovaných sloučenin fosfoethanolaminu, fosfoserinu a fosfoglycerolu.

Metodou HPLC byly nejprve analyzovány standardy fosforylovaných sloučenin na chromatografické koloně HILIC s polární stacionární fází. Při měření bylo využíváno izokratické eluce za použití mobilní fáze acetonitril-amonno-acetátový pufr (85:15, v/v) o pH 4,00. Protože za daných experimentálních podmínek nebyly analyty zadržovány stacionární fází a vycházely z kolony s mrtvým objemem, došlo ke změnám v poměru složek mobilní fáze. S klesajícím podílem acetonitrilu byly zkráceny retenční časy na úkor zhoršení kvality šumu základní linie a separaci se i přesto nepodařilo provést. Proto byla další měření provedena ve stejné mobilní fázi o pH 6,50, přičemž byly prodlouženy retenční časy a také došlo k rozšíření píků, ale analyty se opět nepodařilo separovat.

Při stanovení fosfolipidů metodou HPLC byla použita kolona Diol-HILIC s polární stacionární fází. V tomto případě bylo využíváno gradientové eluce za použití binární mobilní fáze. Navzdory dodržování instrukcí výrobce se nepodařilo ustálit šum základní linie a získat reprezentativní záznamy.

Další pověřovanou analytickou metodou byla NMR. Tato metoda byla použita k identifikaci fosfolipidů. Nejprve byla proměřena ^{31}P NMR spektra jednotlivých standardů fosfolipidů na 400 MHz spektrometru proti 85% H_3PO_4 , jako referenční látce pro kalibraci chemického posunu. Spektra se zřetelnými chemickými posuny se i přes nízký poměr signál-šum podařilo spolehlivě určit. Proto následovala analýza reálných vzorků fosfolipidů izolovaných z cytoplazmatické membrány *B. subtilis*. ^{31}P NMR spektra byla proměřena citlivějším 600 MHz spektrometrem proti stejné referenční látce. Bylo zjištěno, že pro kvalitní záznam, ze kterého se dají spolehlivě určit chemické posuny, je potřeba spojit alespoň 6 paralelních vzorků. Porovnáním chemických posunů reálného vzorku s posuny standardů fosfolipidů bylo zjištěno, že se od sebe zásadně liší. Chemické posuny standardů tedy nelze jednoznačně přiřadit jednotlivým signálům u reálného vzorku.

Další metodou byla CZE. Zatímco fosforylované látky byly analyzovány ve vodném separačním elektrolytu pomocí bezkontaktního vodivostního detektoru (CCD) a diodového detektoru (DAD) při 205 nm, standardy fosfolipidů byly kvůli svému amfipatickému charakteru analyzovány v nevodném prostředí pomocí DAD detektoru při 200 nm.

Standardy fosforylovaných látek byly nejprve analyzovány pomocí fotometrického detektoru přidavkem thiomocoviny, jako markeru EOF. Protože měření nebyla úspěšná, byl fotometrický detektor nahrazen bezkontaktním vodivostním detektorem (CCD). I přes nízké odezvy detektoru se úspěšně podařilo standardy fosforylovaných sloučenin separovat a identifikovat jak individuálně, tak ve směsi. Následovala měření s přidavkem 5, 10, 15 a 20 % organického rozpouštědla. Bohužel v tomto případě nebyla nalezena žádná pozitiva. Výsledkem přidavku organického podílu bylo

prodloužení migračních časů a rozmývání zón analytů. Dále byla provedena měření při nižším separačním napětí a při zvýšené a snížené době dávkování. Snížením napětí byly opět prodlouženy migrační časy a změna doby dávkování nebyla u takto nízké odezvy patrná. Kvůli nízké odezvě používaného CCD detektoru byla analýza směsi fosforylovaných sloučenin provedena na komerčním přístroji kapilární elektroforézy, jehož součástí byl DAD detektor. Separace směsi byla za stejných experimentálních podmínek při vlnové délce 205 nm úspěšně provedena.

Analýza standardů fosfolipidů probíhala v nevodném prostředí při 200 nm. Nejprve byl každý fosfolipid analyzován jednotlivě, poté byla analyzována směs. Měření byla také provedena při nižším separačním napětí. Snížené napětí opět vedlo k prodloužení migračních časů. Odezvy DAD detektoru byly dostačující a úspěšně se tak podařilo vybrané standardy separovat a identifikovat.

Protože se doposud nepodařilo z důvodu velké časové náročnosti určit vhodné experimentální podmínky, které by umožnily analýzu směsi fosfolipidů a fosforylovaných sloučenin, nebyla provedena analýza reálných vzorků izolovaných z *Bacillus subtilis* na HPLC a CZE. Proto se tyto nesplněné cíle stávají předmětem dalších měření. Lze však s jistotou říci, že ze studovaných analytických metod je nejméně vhodnou metodou NMR. Byť se touto metodou podařila ^{31}P NMR spektra naměřit, nepodařilo se identifikovat dílčí signály. Dalším problémem je také požadavek na množství reálného vzorku. Uvědomíme-li si, že jsme schopni izolovat přibližně 1 mg čistého lipidového extraktu z jedné paralely vzorku, a požadavek na změření spektra na nejcitlivějším přístroji (600 MHz) je přibližně šestinásobný, je evidentní, že metoda NMR pro tyto účely selhává, a to i z pohledu doby jedné analýzy, která bývá řádově několik hodin.

Další nevyhovující metodou se zdá být také HPLC, neboť na vybraných kolonách nedocházelo k zadržování analytů a vycházely tak s mrtvým objemem. V tomto případě se problém úspěšného stanovení spíše skrývá ve vhodné detekční metodě. Z dostupných odborných publikací vyplývá, že k úspěšnému stanovení fosfolipidů je zapotřebí HPLC-MS. Z důvodu nedostupnosti HPLC-MS byla měření prováděna pomocí DAD detektoru při vlnové délce 205 nm.

Poslední studovanou metodou byla CZE, kterou se úspěšně podařilo identifikovat jak fosforylované látky, tak fosfolipidy, a proto bude v budoucnu kladen velký důraz na její zdokonalení. Cílem bude zcela jistě analýza reálného vzorku lipidové frakce z *B. subtilis* a identifikace fosfolipidů na základě vypočítaných efektivních elektroforetických mobilit příslušných standardů. V případě fosforylovaných sloučenin pak bude cílem analyzovat co nejvíce těchto látek, aby CZE mohla sloužit jako univerzální metoda.

Přestože byly studovány tři analytické metody, zdá se, že nejsou vyčerpány úplně všechny možnosti pro stanovení těchto látek. Velký potenciál se ukrývá zejména v hmotnostní spektrometrii s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS), viz 2.4.5, a také další elektromigrační metody, zejména kapilární izotachoforéza (Capillary Isotachopheresis, CITP) či micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MEKC). I tyto metody budou předmětem dalších měření.

LITERATURA

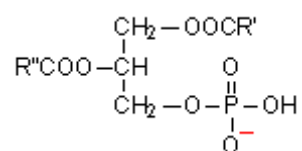
- [1] **Julák, J.** (2006): Úvod do lékařské bakteriologie. Nakladatelství Karolinum, Praha, 1. vydání, ISBN 80-246-1270-4.
- [2] **Kaprálek, F.** (1986): Fyziologie bakterií. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1. vydání.
- [3] **Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I, et al.** (1997): The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. **390(6657)**: 249-56.
- [4] **Fekete, T.** (2009): *Bacillus* species (not *anthracis*). *Clinical Microbiology Newsletter* 31:12.
- [5] <http://www.natur.cuni.cz/biologie/genetika/veda-a-vyzkum-1/laborator-genetiky-bakterii/laborator-genetiky-bakterii>, cit. 21.3.2013.
- [6] **Votava, M., a kol.** (2003): Lékařská mikrobiologie speciální. Vydavatelství Neptun, Brno, vydání 2003, ISBN 80-902896-6-5.
- [7] **Šilhánková, L.** (1995): Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Nakladatelství Victoria publishing, a.s., Praha, 2. vydání, ISBN 80-85605-71-6.
- [8] **Rosypal, S., a kol.** (1981): Obecná bakteriologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1. vydání.
- [9] **Alberts, B., et al.,** (1998): Základy buněčné biologie. Nakladatelství Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 2. vydání, ISBN 80-902906-2-0.
- [10] **Signer, S.J., Nicolson, G.L.** (1972): Citováno podle Yeagle, P.L. (2005): The structure of biological membranes. Second Edition, CRC Press.
- [11] **Dowhan, W., Bogdanov, M.** (2002): Functional roles of lipids in membranes. Elsevier Science B.V. (2002).
- [12] **Fišar, Z.** (2004): Antidepresiva a membránové lipidy. *Klin. Farmakol. Farm.*, **18**: 198-202.
- [13] **Bishop, D.G., Rutberg, L., Samuelsson, B.** (1967): The chemical composition of the cztoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *European J. Biochem.* **2**: 448-453.
- [14] **Kaneda, T.,** (1977): Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol. Rev.*, p. 391-418.
- [15] **Kaneda, T.,** (1991): Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*, p. 288-302.
- [16] **Cronan, J.E.Jr.** (2002): Phospholipid modifications in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **5**: 202-205.
- [17] **Roland, M.A.** (1997): Principles of microbiology. Wm. C. Brown Publishers, 2nd edition, ISBN 0-8151-0889-3.
- [18] **Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R.** (2002): *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, D.C. 1-55581-205-8.
- [19] **Lindgren, V., Holmgren, E., Rutberg, L.** (1997): *Bacillus subtilis* mutant with temperature – sensitive net synthesis of phosphatidylethanolamine. *American Society for Microbiology U.S.A.*, p. 473-484.
- [20] **Huijbregts, R.P.H., de Kroon, A.I.P.M., de Kruijff, B.** (2000): Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**: 43-61.
- [21] **Matsumoto, K.** (1997): Phosphatidylserin synthetase from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1348**: 214-227.
- [22] **Glass, R.L.** (1971): Alcoholysis, saponification and the preparation of fatty acid methyl esters. *Scientific Journal Series*, vol. **6**, p 919-925.

- [23] Seydlová, G. (2011): Mechanismus rezistence cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis* k surfaktinu. Univerzita Karlova, Katedra genetiky a mikrobiologie, Dizertační práce, Praha.
- [24] Červinková, J. (2011): Vývoj metody kapilární elektroforézy pro stanovení fosforylovaných složek bakteriálních buněčných membrán. Univerzita Karlova, Katedra analytické chemie, Bakalářská práce, Praha.
- [25] Lábler, L., a kol. (1965): Chromatografie na tenké vrstvě. Nakladatelství ČSAV, Praha, 1. vydání.
- [26] Nováková, O., a kol. (2004): Návod k praktiku z biochemie pro biology. Nakladatelství Karolinum, Praha, 1. vydání, ISBN 80-246-0880-4.
- [27] Julák, J. (1997): Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy. Nakladatelství Karolinum, Praha, 1. vydání, ISBN 80-7184-451-9.
- [28] Bosáková, Z., Coufal, P., Jelínek, I., Pacáková, V., Ševčík, J.G.K., Štulík, K. (2004): Analytické separační metody. Nakladatelství Karolinum, Praha, 1. vydání, ISBN 80-246-0852-9.
- [29] Poušek, L., Bindzar, J., Zimová, J. (2008): Přehled biochemie člověka. České vysoké učení technické, Praha, ISBN 978-80-01-03999-1.
- [30] Karlíček, R., Polášek, M., Pospíšilová, M., Solich, P. (2001): Analytická chemie pro farmaceuty. Nakladatelství Karolinum, Praha, 2. vydání, ISBN 80-246-0348-9.
- [31] Harrabi, S., Herchi, W., Kallel, H., Mayer, P.M., Boukhchina, S. (2009): Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of glycerophospholipids in corn oil. *Food Chemistry* **114**: 712 – 716.
- [32] Boukhchina, S., Sebai, K., Cherif, A., Kallel, H., Mayer, P.M. (2004): Identification of glycerophospholipids in rapeseed, olive, almond, and sunflower oils by LC-MS and LC-MS-MS. *J. Chem.* **82**: 1210-1215.
- [33] Lin, J.T., Mc Keon, T.A. (2005): HPLC of acyl lipids – The Evaporative Light-Scattering Detector as a Tool for the Analysis of Lipids by HPLC. Nakladatelství HNB Publishing, New York, ISBN 0-9728061-1-3.
- [34] Conforti, F.D., Harris, C.H., Rinehart, J.T. (1993): High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector. *Journal of Chromatography*, **645**: 83-88.
- [35] Němcová, I. a kol. (1998): Spektrometrické analytické metody II. Nakladatelství Karolinum, Praha, 1. vydání, ISBN 80-7184-586-8.
- [36] Schiller, J., Arnold, K. (2002): Application of high resolution ^{31}P NMR spectroscopy to the characterization of the phospholipid composition of tissues and body fluids – a methodological review. *Med Sci Monit*, **8** (11): 205-222.
- [37] Schiller, J. et al. (2001): Lipid analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BAL) by MLADI-TOF mass spectrometry and ^{31}P NMR spectroscopy. *Chem Phys Lipids*, vol. **112**, p. 67-79.
- [38] Guo, B.Y., Wen, B., Shan, X.Q. (2005): Separation and determination of phospholipids in plant seeds by nonaqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1074**: 205–213.
- [39] Khaledi, M.G. (1998): High performance capillary electrophoresis: Theory, techniques, and applications. Wiley, New York, ISBN 978-0-471-14851-7.
- [40] Beckers, J.L., Everaerts, F.M. (1972): Isotachopheresis: The qualitative separation of cation mixtures. *J. Chromatogr.*, vol. **68**: 207-230.

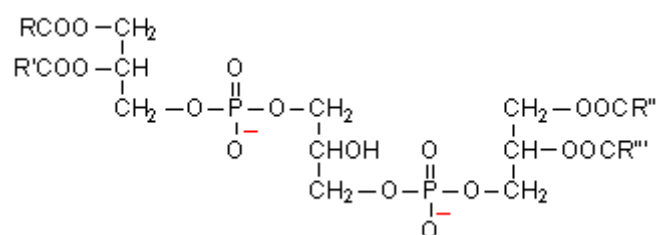
- [41] **Reijenga, J.C., Slaats, H., Everaerts, F.M.** (1983): Determination of conjugated bile acids in human bile by isotachopheresis in a non-aqueous solvent using a.c. conductivity and UV detection. *J. Chromatogr.*, vol. **267**: 85-89.
- [42] **Reikkola, M.L.** (2002): Recent advances in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, vol. **23**: 3865-3883.
- [43] **Geiser, L., Veuthey, J.L.** (2007): Nonaqueous capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Electrophoresis*, vol. **28**: 45-57.
- [44] **Hillenkamp, F., Katalinic, P.J.** (2007): MALDI MS: a partical guide to instrumentation, methods and applications. Weinheim: Wiley-VCH, 1. vydání, ISBN 3-527-31440-9.
- [45] **Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J.** (2000): Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom.*, vol. **35**: 1-12.
- [46] **Nicolau, A., Kokotos, G.** (2004): Bioactive lipids. Bridgwater: Oily Press, 1. vydání, ISBN 0 9531949-7-3.
- [47] **Li, Y.L., Gross, M.L., Hsu, F.F.** (2005): Ionic-Liquid Matrices for improved analysis of phospholipids by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry*, vol. **16**: 679-682.
- [48] **Schiller, J. et al.** (1999): Lipid analysis by Matrix-Assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach. *Anal. Biochem.*, vol. **267**: 46-56.

PŘÍLOHY

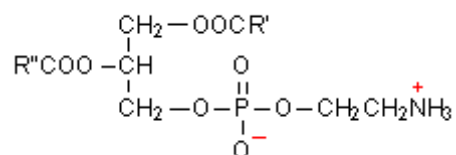
Příloha 1 - Chemický vzorec kyseliny fosfatidové (PA)



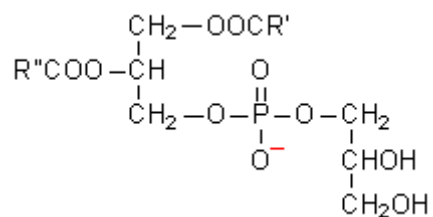
Příloha 2 - Chemický vzorec kardiolipinu (CL)



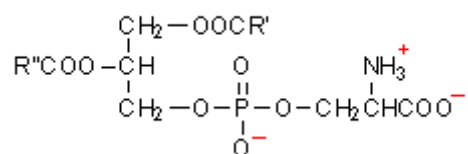
Příloha 3 - Chemický vzorec fosfatidylethanolaminu (PE)



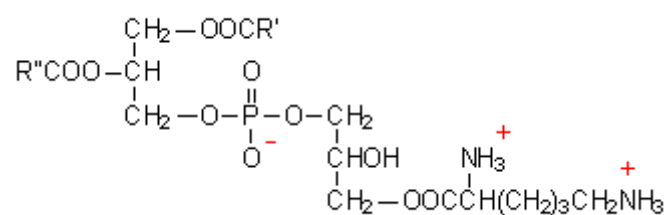
Příloha 4 - Chemický vzorec fosfatidylglycerolu (PG)



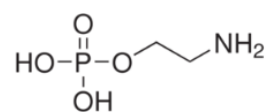
Příloha 5 - Chemický vzorec fspfatidylserinu (PS)



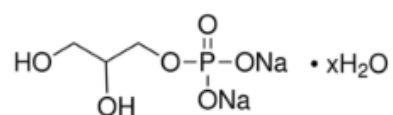
Příloha 6 - Chemický vzorec lysofosfolipidu



Příloha 7 - Chemický vzorec fosfoethanolaminu



Příloha 8 - Chemický vzorec fosfoglycerolu



Příloha 9 - Chemický vzorec fosfoserinu

